

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## VACCINATION DU CHEVAL PAR L'ANATOXINE TÉTANIQUE

par P. DESCOMBEY.

*(Institut Pasteur, annexe de Garches.)*

Des essais de vaccination contre le tétanos ont été faits à plusieurs reprises chez l'homme et chez les animaux. Au cours de la dernière guerre notamment, notre maître le P<sup>r</sup> Vallée et le D<sup>r</sup> Bazy ont réalisé l'immunisation de l'homme par l'injection de mélanges de toxine tétanique et de liqueur de Gram. Plus récemment, Okuda a vacciné, au moyen de mélanges analogues, des animaux de laboratoire (lapin, cobaye) et certaines espèces domestiques (mouton, chèvre, cheval). Etudiant les qualités antigéniques des toxines traitées par l'iode, cet auteur ne fait que confirmer des notions classiques et déjà anciennement établies.

Mais les qualités immunisantes des toxines iodées, pour réelles qu'elles soient, n'en demeurent pas moins faibles et, en quelques jours, les mélanges de toxine et de liqueur de Gram perdent toute leur activité. Ces mélanges constituent donc des antigènes instables et de valeur médiocre. D'où la nécessité de les employer à des doses élevées et dans les heures qui suivent leur préparation.

S'ils permettent, ainsi que l'ont montré Roux et Martin, d'en-

treprendre en toute sécurité l'immunisation des animaux, c'est difficilement qu'ils pourraient être utilisés en grand pour vacciner contre le tétanos et, en réalité, ils n'ont été, jusqu'à présent, l'objet d'aucune utilisation pratique de cet ordre, à notre connaissance tout au moins.

A la suite des travaux de Löwenstein, von Eisler a tenté, sans succès, l'immunisation de l'homme au moyen de toxine tétanique traitée par l'aldéhyde formique. Son échec s'explique aisément si l'on considère que l'on ne pouvait alors ni évaluer le pouvoir antigène des toxines, ni apprécier, fût-ce grossièrement, la dégradation subie par ce pouvoir antigène du fait de l'action des divers agents physiques ou chimiques employés pour détruire la toxicité des toxines. Cette dégradation était considérable puisque l'immunisation du cobaye nécessitait l'injection de 1 à 5 cent. cubes du vaccin de von Eisler, doses très importantes eu égard au poids de l'animal considéré. Il s'agissait, là encore, d'un antigène peu actif.

Au cours de ses recherches sur l'anatoxine diphtérique, notre collègue et ami Ramon nous incita à étudier l'anatoxine tétanique et nous fit entrevoir les avantages que l'on pourrait retirer de son emploi au point de vue de la prophylaxie du tétanos (1).

Dans une communication antérieure (2) nous avons fait connaître sommairement les propriétés de l'anatoxine tétanique; en même temps nous envisagions déjà la possibilité de l'utiliser d'une façon courante pour l'immunisation des animaux. Ce travail est l'exposé des recherches que nous avons faites en ce sens.

### L'anatoxine tétanique.

Sans entreprendre ici une étude complète et détaillée de l'anatoxine tétanique, nous nous bornerons à donner quelques détails concernant sa préparation et à mettre en relief certaines de ses qualités essentielles, notamment son pouvoir antigène considérable.

(1) Nous sommes heureux d'adresser ici à notre collègue et ami Ramon nos plus chaleureux remerciements pour les conseils qu'il nous a prodigués et pour les encouragements qu'il nous a donnés.

(2) *Comptes rendus des Séances de la Société de Biologie*, 91, p. 239.

## 1° DÉFINITION.

Nous ne saurions mieux faire, pour définir l'anatoxine tétanique, que d'appliquer à son cas particulier la définition générale des anatoxines telle que l'a donnée Ramon (1). Nous dirons donc que *l'anatoxine tétanique est un produit qui a perdu toute la nocivité de la toxine tétanique dont il dérive, mais qui en possède encore la valeur floculante et en a conservé également toutes les propriétés immunisantes.*

## 2° PRÉPARATION.

Considérons une toxine tétanique (2) qui, en injection intramusculaire, tue en quatre ou cinq jours le cobaye de 300 grammes à la dose de 0 c. c. 0001. Mélangée à un sérum antitétanique étalon titrant 5.000 unités, elle flocule dans les proportions de 20 cent. cubes de toxine pour 0 c. c. 35 de sérum. Ajoutons à cette toxine 2 cent. cubes p. 1.000 d'une solution à 40 p. 100 d'aldéhyde formique. Plaçons le mélange à l'étuve à la température de 37-38°.

Si, dans la suite, nous effectuons des prélèvements successifs, nous constatons, par l'injection au cobaye, que la toxicité du mélange s'abaisse progressivement. Cet abaissement de la toxicité est particulièrement rapide et manifeste dans les tout premiers jours. C'est ainsi qu'après quarante-huit heures seulement de séjour à l'étuve, la toxine formolée ne donne même plus de tétanos local au cobaye à la dose de 0 c. c. 0005, la dose minima mortelle n'étant plus alors que de 0 c. c. 01. Après cinq ou six jours, l'injection au cobaye de la dose énorme de 5 cent. cubes est incapable de provoquer le moindre accident local de tétanos. A ce moment cependant la toxicité est encore loin d'être totalement abolie, et si l'injection de 5 cent. cubes ne provoque pas de contractures locales, elle est suivie néanmoins, après

(1) RAMON. *Paris médical*, 6 décembre 1924.

(2) Les toxines tétaniques qui nous ont servi à préparer les anatoxines que nous avons utilisées dans nos expériences proviennent du service de M. le Dr Louis Martin. Nous adressons nos remerciements à M. Martin et à ses collaborateurs.

quatre jours environ, d'un tétanos généralisé mortel (1).

Ce pouvoir de déterminer du tétanos généralisé d'emblée ne disparaît qu'à la longue et on constate que les accidents de cet ordre sont à échéance d'autant plus éloignée que la toxine a séjourné plus longtemps à l'étuve. Ils peuvent apparaître cinq, dix, douze jours après l'injection.

C'est seulement lorsque l'injection sous-cutanée de 40 cent. cubes est devenue tout à fait inoffensive pour le cobaye, lorsqu'elle ne provoque plus chez lui aucun accident précoce ou tardif d'intoxication au cours d'une observation de plusieurs semaines, que la toxine est transformée en anatoxine. Ce résultat, pour la toxine envisagée et traitée comme nous l'avons dit, est obtenu en vingt jours environ.

Si nous examinons le pouvoir floculant de la toxine formolée au cours de son séjour à l'étuve et jusqu'à sa transformation en anatoxine nous constatons, en utilisant toujours le même sérum, que le « taux de floculation », c'est-à-dire les proportions respectives des deux constituants du mélange floculant, reste invariable : *il constitue une véritable constante du phénomène.*

Par contre, le temps nécessaire à la manifestation du phénomène de floculation (nous l'appellerons pour la commodité de cet exposé « temps de floculation ») est d'autant plus long que la toxine ou l'anatoxine ont séjourné davantage à l'étuve. Si, par exemple, la toxine originelle flocule en deux heures trente minutes à la température de 45°, la toxine formolée à 2 p. 1.000 floculera avec le même sérum en cinq heures après deux jours d'étuve, en sept heures après six jours, en neuf heures après dix jours, en quatorze heures après vingt jours, la réaction s'effectuant toujours à la même température de 45°.

Si le temps de floculation d'une anatoxine dépend, comme nous venons de le voir, de la durée de son séjour à l'étuve, il dépend en outre de la quantité de formol employée pour sa préparation. Au lieu de 2 cent. cubes, ajoutons à la toxine tétanique, toujours la même, 5 cent. cubes p. 1.000 de formol. Nous voyons que le temps de floculation est de sept heures trente après deux jours d'étuve seulement. Il atteint dix-

(1) Ces accidents sont à rapprocher de ceux que l'on observe lors de l'injection de mélanges toxine sérum antitétanique incomplètement neutralisés.

huit heures après six jours et s'allonge tellement par la suite que toute interprétation, sinon toute observation du phénomène de floculation, devient impossible. L'abaissement de la toxicité est plus rapide, il est vrai, mais l'anatoxine obtenue flocule malgré tout en un temps très long. Or, Ramon a montré que la lenteur excessive de la réaction de floculation caractérise les antigènes de qualité inférieure. Nous montrerons que cette donnée, d'une portée générale, s'applique parfaitement à l'anatoxine tétanique.

Des doses de formol telles que 1 cent. cube ou 0 c. c. 5 p. 1.000 n'ont, sur la toxicité, qu'une influence médiocre et donnent de mauvais résultats, car il faut, si on a recours à de telles quantités de formol, prolonger l'action de la température de l'étuve. Leur emploi n'est pas à conseiller.

Il faut donc, dans la préparation de l'anatoxine tétanique, comme dans celle de toutes les anatoxines, employer des quantités de formol assez considérables pour détruire le plus rapidement possible la toxicité, assez faible cependant pour altérer au minimum le pouvoir antigène de la toxine employée. L'intégrité plus ou moins grande de ce pouvoir antigène est susceptible, comme nous allons le voir, d'être contrôlée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. A titre d'indication, signalons que, pour des toxines dont la toxicité fut comprise entre 1/3.000 et 1/15.000, nous avons obtenu de bons résultats avec des doses de formol variant de 1 c. c. 5 à 3 cent. cubes p. 1.000 et en faisant agir la température de l'étuve pendant un temps compris entre quinze et vingt-cinq jours.

### 3° POUVOIR ANTIGÈNE (1).

Nous avons vu que l'anatoxine tétanique est un produit dépourvu de toute espèce de toxicité. Il nous reste à examiner quelles sont ses qualités immunisantes.

Considérons une anatoxine comparable à l'anatoxine type que nous venons de décrire. Injectons-en 1 cent. cube sous la

(1) Tout ce que nous rapporterons, relativement au pouvoir antigène de l'anatoxine, soit chez le cobaye, soit chez le cheval, s'entend d'une anatoxine comparable, aux points de vue de son origine, de sa préparation et de son activité, à l'anatoxine type dont nous venons de décrire et de suivre la préparation.

peau à un certain nombre de cobayes. Au bout de deux à trois semaines, ceux-ci résistent déjà parfaitement à l'injection intramusculaire d'une quantité de toxine tétanique plusieurs fois mortelle pour les témoins. Loin de fléchir, cette résistance s'accroît encore par la suite, et tellement qu'au bout de deux à trois mois, les cobayes supportent, sans aucun symptôme de tétanos, plusieurs milliers de doses mortelles de toxine.

Mais des doses bien moindres d'anatoxine tétanique suffisent à conférer au cobaye une résistance encore très notable. Des cobayes qui reçoivent, en injection sous-cutanée, 0 c. c. 1 d'anatoxine, acquièrent une immunité qui leur permet, soixante jours après la vaccination, de résister, sans tétanos local, à l'épreuve de dix doses mortelles de toxine (dont l'activité est contrôlée sur des témoins). L'injection à de tels sujets de vingt doses mortelles est suivie de tétanos local, mais n'entraîne pas la mort.

Le pouvoir antigène de l'anatoxine tétanique est donc considérable et le paraît encore bien plus si on compare les chiffres que nous venons de fournir à ceux que donne Okuda dans son travail sur les toxines iodées. Okuda dit, en effet, qu'il faut 3 injections de 1 à 5 cent. cubes de toxine iodée pour créer, chez le cobaye, une immunité qui lui permette de résister à une dose mortelle seulement.

Toutes les anatoxines, même lorsqu'elles procèdent d'une même toxine originelle, ne possèdent pas un égal pouvoir antigène. Nous avons vu qu'en partant d'une même toxine, on peut, suivant le mode de préparation mis en œuvre, obtenir des anatoxines qui, tout en flocculant au même taux avec le même sérum, flocculent en des temps différents à la même température. Ramon montre que, d'une façon générale, pour toutes les anatoxines, le pouvoir antigène est d'autant plus considérable que le temps de flocculation est plus réduit (1). L'anatoxine tétanique n'échappe point à cette règle.

Considérons deux anatoxines de même origine, flocculant au même taux, avec le même sérum, l'une en quatre heures, l'autre en sept heures à la température de 55-57°. Injectons 0 c. c. 5 de la première à chacun des cobayes d'un premier lot, 0 c. c. 5 de

(1) RAMON. *C. R. Acad. des Sciences*, 177, 10 décembre 1923, p. 1338.

la seconde à chacun des cobayes d'un deuxième lot. Au bout d'un mois, éprouvons tous ces sujets avec des quantités de toxine tétanique variant de une à cinq cents doses mortelles. Des doses correspondantes de la même toxine amènent la mort des témoins en des temps compris entre vingt-quatre heures et cinq jours. Dans le premier lot, les cobayes éprouvés par une à cinq doses mortelles ne présentent aucun accident; de cinq à cinquante doses mortelles, le tétanos local s'observe chez 50 p. 100 des sujets éprouvés; de cent à cinq cents doses mortelles, le tétanos local apparaît régulièrement chez tous les cobayes, mais n'est pas suivi de mort. Par opposition, dans le deuxième lot de vaccinés, nous enregistrons 50 p. 100 de cas de tétanos local avec une dose mortelle seulement; 100 p. 100, à partir de deux doses mortelles. La mort survient, irrégulièrement d'ailleurs, quand on atteint deux cents doses mortelles.

Le temps de floculation peut donc servir à apprécier le pouvoir antigène des anatoxines. Il va sans dire que le taux de floculation reste l'élément fondamental de cette appréciation.

Notons que le pouvoir antigène de l'anatoxine tétanique reste inaltéré pendant des mois, que l'anatoxine soit conservée à la glacière ou à la température du laboratoire. L'anatoxine tétanique constitue donc un antigène de valeur fixe, parfaitement stable.

### Vaccination du cheval.

Les résultats que nous avons obtenus chez le cobaye nous ont engagé à tenter l'immunisation du cheval par l'injection de faibles doses d'anatoxine. Les recherches que nous avons entreprises sur ce sujet montrent que la vaccination du cheval contre le tétanos est pratiquement réalisable, que l'injection de doses réduites d'anatoxine rend les sujets de cette espèce réfractaires, tant à une intoxication expérimentale sévère qu'à la maladie naturellement contractée. L'état actuel de ces recherches nous permet, en outre, d'apporter quelques précisions concernant les délais nécessaires à l'établissement de l'immunité, les modes de contrôle et d'appréciation de cette immunité et sa durée.

## 1° RÉSISTANCE A L'INTOXICATION EXPÉRIMENTALE.

Un certain nombre de chevaux vaccinés soit par trois, soit par deux injections sous-cutanées d'anatoxine tétanique, ont été éprouvés par l'injection sous-cutanée de 1 cent. cube d'une des toxines couramment utilisées à l'Institut Pasteur pour l'immunisation des chevaux producteurs de sérum antitétanique, et dont l'activité est toujours contrôlée sur le cobaye. Cette quantité de toxine représente à coup sûr plusieurs dizaines de doses mortelles pour un cheval neuf. Il s'agit donc d'une épreuve sévère. Notons, en outre, que, chez les chevaux vaccinés par trois injections, la dose d'épreuve a été doublée.

Les douze chevaux utilisés dans cette expérience ont été préparés et éprouvés suivant des modalités dont voici l'exposé :

1° Deux chevaux reçoivent chacun trois injections de 20, 20 et 30 cent. cubes d'anatoxine. Pour ces deux chevaux, un intervalle de sept jours a séparé chaque injection de la suivante. Ils reçoivent chacun, sept jours après la troisième injection, 2 cent. cubes de toxine tétanique.

2° Cinq chevaux reçoivent chacun deux injections d'anatoxine de 20 cent. cubes, faites pour chacun d'eux à sept jours d'intervalle l'une de l'autre. Sept jours après la deuxième injection, l'un d'eux reçoit, à titre d'épreuve, 1 cent. cube de toxine tétanique; les quatre autres reçoivent une dose égale de toxine sept jours plus tard, soit quatorze jours après la deuxième injection.

4° Trois chevaux reçoivent chacun deux injections, la première de 15, et la deuxième, sept jours plus tard, de 20 cent. cubes d'anatoxine. L'épreuve de leur immunité est faite quatorze jours après cette dernière injection. Elle consiste, comme pour les autres chevaux, en l'injection sous-cutanée de 1 cent. cube de toxine tétanique.

Tous ces chevaux ont parfaitement supporté l'injection de la dose d'épreuve de 1 ou de 2 cent. cubes de toxine. Aucun n'a présenté le moindre symptôme général ni local de tétanos. Tous ont, par la suite, reçu des doses progressivement croissantes de toxine tétanique et leur hyperimmunisation a été menée à bien sans que nous ayons eu à déplorer aucun accident.

Si nous examinons les délais qui ont été nécessaires à l'établissement de cette immunité, nous constatons qu'ils sont de vingt-huit jours pour les chevaux du premier lot, de quatorze et vingt et un jours pour ceux du deuxième, de vingt et un jours pour ceux des troisième et quatrième lots. Ils sont comparables à ceux que nécessitent les vaccinations couramment pratiquées chez les animaux. En d'autres termes, il ne faut pas plus longtemps pour rendre un cheval réfractaire au tétanos, que pour rendre un mouton réfractaire au charbon bactérien.

Nous pouvons conclure que deux injections de 20 cent. cubes (ou de 15 et 20 c. c.) d'une anatoxine tétanique telle que celle que nous avons employée, suffisent pour créer, chez le cheval, en l'espace de deux ou trois semaines, un état d'immunité très satisfaisant.

## 2° RÉSISTANCE A LA MALADIE NATURELLE.

Dans les conditions naturelles, les animaux n'ont pas à redouter le contact subit et brutal d'une quantité de toxine tétanique comparable à celle que nous avons utilisée dans l'expérience précédente. Ils sont exposés simplement à la souillure d'une plaie par des spores tétaniques associées à des germes et à des substances issus du milieu dont procèdent les spores elles-mêmes. Ces germes et ces substances associés contribuent à procurer aux spores les conditions nécessaires à leur germination et à la sécrétion de la toxine. Cette sécrétion *in vivo* de la toxine, il nous est impossible de l'apprécier exactement quant à son abondance et quant à sa qualité. De toute évidence cependant, elle ne saurait être soudaine, brutale, elle ne peut être que progressive. Dans ces conditions, pour que l'immunité soit assurée, il faut et il suffit que l'organisme vacciné détruise ou, plus exactement, neutralise la toxine formée, jusqu'à ce que les moyens de défense dont il dispose aient mis les spores et les éléments mycéliens tétaniques hors d'état de nuire. L'état d'immunité suffisant à cette exigence ne semble donc pas devoir être nécessairement supérieur à celui que nécessite la neutralisation immédiate d'une énorme quantité de toxine brutalement introduite dans l'organisme. Il est probable que la neutralisation de la toxine se fait peu à

peu, au fur et à mesure de sa formation, peut-être aussi au fur et à mesure de la formation corrélative de l'antitoxine. Etant donné que les vaccinés de l'expérience précédente ont résisté à une intoxication sévère, nous pensons pouvoir en induire que des chevaux vaccinés de façon analogue doivent résister à la maladie naturelle, même dans ses formes les plus graves. Et c'est en effet ce que l'expérimentation permet de vérifier.

Pour éprouver les chevaux que nous avons vaccinés à cet effet, nous avons utilisé des échardes préparées de la façon suivante :

Dans une culture de bacille tétanique âgée de trois semaines, riche en spores, sont introduits de petits fragments de bois, préalablement stérilisés. On agite le tube de temps en temps, pour bien répartir les spores dans toute la masse de la culture. Le lendemain, le tout est placé au bain-marie et y est maintenu pendant une heure trente minutes, à la température de 80°. Après quoi, les échardes sont plongées dans un mélange de trois cultures en milieu liquide de : staphylocoque, bacille pyocyanique, bacille de Friedländer (1). Les échardes sont prêtes à être employées. *Une écharde ainsi préparée donne toujours au cobaye un tétanos mortel.*

Les animaux à éprouver sont rasés à la partie moyenne de l'encolure, au niveau du muscle mastoïdo-huméral. La région est soigneusement lavée et aseptisée. Un trocart à saignée, de fort calibre, est enfoncé au centre de la région ainsi préparée et poussé profondément jusque dans les muscles du noyau cervical. La tige du trocart retirée, une écharde est introduite dans la canule et la tige, remise en place, la pousse jusqu'au contact des tissus. Le trocart est retiré en bloc, la plaie qu'il laisse est recouverte de collodion.

*L'écharde, placée dans ces conditions, en plein tissu musculaire, n'a jamais été éliminée.*

Ainsi avons-nous opéré pour deux des chevaux (1 et 2) que nous avons utilisés dans cette expérience. Pour les autres (3, 4, 5 et 6), afin de rendre l'épreuve plus sévère encore, nous

1. Nous devons remercier ici M. le Dr Legroux qui a mis à notre disposition les souches microbiennes qui nous ont permis de mener à bien cette expérience.

avons en outre imprégné les échardees d'un sel de quinine.

1° Deux chevaux, 1 et 2, reçoivent : 1, deux injections sous-cutanées d'anatoxine tétanique de 20 cent. cubes chacune, faites, la première le 26 juin, la deuxième le 10 juillet 1924 ; 2, deux injections de 10 cent. cubes de la même anatoxine, faites aux mêmes dates que pour 1.

Le 20 juillet ces deux chevaux reçoivent, en même temps qu'un témoin, chacun une écharde. Le 14 août, soit après une incubation de deux semaines, le cheval témoin présente les premiers signes d'un tétanos bientôt généralisé. Il meurt de tétanos le 27 août, après treize jours de maladie, tandis que les deux vaccinés restent indemnes et le sont encore aujourd'hui.

2° Quatre chevaux 3, 4, 5 et 6, reçoivent respectivement les quantités suivantes d'anatoxine, la même que pour 1 et 2 : 3, deux injections sous-cutanées de 10 cent. cubes chacune, faites le 26 juin et le 10 juillet 1924 ; 4 et 5, une seule injection de 10 cent. cubes le 26 juin ; 6, une seule injection de 20 cent. cubes à la même date.

Le 4 novembre 1924, soit, suivant le cas, quatre mois ou quatre mois et demi après la vaccination, ces quatre chevaux reçoivent chacun une écharde en même temps qu'un témoin.

Le 13 novembre, après neuf jours d'incubation, le cheval témoin présente du tétanos local du côté de l'insertion de l'écharde. En même temps, trismus, projection du corps clignotant. Les symptômes s'aggravent rapidement : le lendemain 14 novembre, le témoin est en décubitus latéral complet avec tous les signes du tétanos généralisé. Il meurt le 15, après deux jours de maladie.

Le 14 novembre, après dix jours d'incubation, le cheval 5, préparé par une seule injection de 10 cent. cubes d'anatoxine, présente les premiers symptômes du tétanos. Ces symptômes s'aggravent le 15. Le 16, le tableau clinique du tétanos est complet, le cheval se couche ; il meurt le 17, après trois jours de maladie.

Le 18 novembre, après quatorze jours d'incubation, le cheval 6, préparé par une injection de 20 cent. cubes d'anatoxine, présente du tétanos local de l'encolure du côté de l'insertion de l'écharde. Le 19, pas de changement. Les jours suivants, les contractures s'aggravent, le tétanos restant tou-

jours local. Le 29, l'encolure est complètement repliée sur elle-même, la tête ramenée à la hauteur du garrot. A cette date, l'animal se déplace encore aisément, il mange et boit, bien qu'avec difficulté, les aliments et les boissons qu'on lui présente. Il meurt le 2 décembre, après quinze jours de maladie.

Les chevaux 3 et 4 sont restés indemnes et vivent encore aujourd'hui. 3 avait reçu deux injections de 10 cent. cubes ; 4 une seule injection de la même quantité d'anatoxine.

Cette expérience, considérée dans son ensemble, nous montre :

1° Que, chez les chevaux vaccinés par deux injections successives d'anatoxine (1, 2 et 3), l'immunité est toujours satisfaisante. Nous ne relevons chez eux aucun cas de tétanos, même local ;

2° Que chez ceux, par contre, qui ne reçurent qu'une injection d'anatoxine, l'immunité est le plus souvent défailante. Sur trois chevaux l'un, 5, meurt de tétanos aigu à évolution rapide ; un autre, 6, meurt de tétanos, bien que le caractère local et la marche chronique de sa maladie montrent qu'il possédait cependant une certaine immunité. Un seul enfin, 4, résiste complètement. Nous pouvons constater, en outre, après bien d'autres, qu'il y a, entre les animaux de même espèce, des différences individuelles de réceptivité considérables. Un cheval préparé par une injection de 10 cent. cubes d'anatoxine résiste, alors que la même dose ne développe aucune immunité chez un second, et qu'une dose double ne donne à un troisième qu'une immunité très précaire et insuffisante.

### 3° CONTRÔLE DE L'IMMUNITÉ PAR LA RECHERCHE DE L'ANTITOXINE CHEZ LES VACCINÉS.

S'il est commode d'éprouver les sujets vaccinés par l'injection d'une dose connue, fixe, de toxine tétanique, ou par l'insertion d'une écharde, ces procédés sont cependant critiquables et imparfaits. Ils sont toujours coûteux puisqu'ils comportent le sacrifice des sujets mal immunisés et des témoins. Ils ont, en outre, cet inconvénient grave, que les sujets éprouvés, soit par la toxine, soit par l'écharde, sont, en fait, des sujets sacrifiés au point de vue expérimental. L'une ou l'autre de ces

épreuves constitue le terme ultime d'une expérience, car il n'est pas possible de suivre les progrès ou le déclin de l'état d'immunité chez des animaux éprouvés de la sorte. L'épreuve elle-même est de nature à modifier l'état humoral des vaccinés, à renforcer leur résistance et à la prolonger dans le temps. Il devient nécessaire, si l'on a recours à de tels procédés d'information ou de contrôle, de multiplier le nombre des animaux d'expérience, ce qui, au point de vue économique tout au moins, est un obstacle sérieux. Pour remédier à ces inconvénients, l'idée vient immédiatement à l'esprit de contrôler et d'apprécier l'état d'immunité par la recherche de l'antitoxine dans les humeurs des vaccinés. C'est pourquoi nous nous sommes attaché à mettre en relief les deux points suivants :

1° La vaccination par l'anatoxine tétanique entraîne, chez le cheval, l'apparition d'antitoxine dans les humeurs ;

2° L'immunité est dans l'étroite dépendance des qualités antitoxiques des humeurs.

Des expériences faites sur le cobaye montrent que, chez les sujets de cette espèce, l'injection d'anatoxine tétanique est suivie de l'apparition, dans les humeurs, de très notables quantités d'antitoxine. Des cobayes, vaccinés par l'injection de 0 c. c. 1 d'anatoxine, fournissent, après deux mois, époque où l'immunité est devenue très solide, un sérum dont 0 c. c. 5 neutralise parfaitement, *in vitro*, deux doses mortelles de toxine tétanique. L'injection du mélange au cobaye n'est suivie d'aucun accident, même local, de tétanos, alors que les témoins meurent le quatrième jour après l'injection. Il y a donc, chez le cobaye vacciné, des anticorps décelables. En est-il de même chez le cheval ?

Pour résoudre cette question, capitale dans ce cas particulier, et d'ailleurs intéressante au point de vue purement spéculatif, le 4 novembre 1924, avant de les éprouver par le procédé de l'écharde, nous avons prélevé quelques centimètres cubes de sang aux chevaux 3, 4, 5 et 6, qui ont fait l'objet d'une étude antérieure. Nous avons pu ainsi contrôler, par deux procédés parallèles, l'immunité de ces sujets. Les résultats obtenus dans les deux cas ont d'ailleurs été exactement superposables.

Pour éprouver l'activité des sérums ainsi obtenus, nous

avons mélangé une dose fixe de ces sérums, 2 cent. cubes, à des quantités variables de toxine tétanique : une demi-dose ou une dose mortelle (pour chacune de ces quantités de toxine, et pour chaque sérum, deux cobayes ont été injectés : soit 4 cobayes par échantillon de sérum). Des témoins ont été faits pour chacune de ces deux quantités de toxine : ceux qui reçurent une demi-dose mortelle présentèrent du tétanos local, quarante-huit heures après l'injection; ceux qui reçurent une dose mortelle, présentèrent du tétanos local après vingt-quatre heures d'incubation et moururent cinq jours après l'injection.

Pour rendre plus démonstratif le parallélisme des résultats que nous avons obtenus par l'épreuve de l'écharde et par le titrage de l'antitoxine, nous placerons côte à côte, pour chaque cheval, les résultats obtenus dans ces deux ordres d'expérience. De cette façon, on peut se rendre compte aisément que l'immunité, traduite par la résistance à l'épreuve de l'écharde, coïncide avec la présence d'antitoxine dans le sérum; que l'absence d'antitoxine coïncide avec l'absence de l'immunité.

Le cheval 3, qui a reçu deux injections de 10 cent. cubes d'anatoxine, a parfaitement résisté à l'épreuve de l'écharde. Parallèlement, les cobayes sur lesquels a été contrôlée l'activité de son sérum ont tous résisté. Aucun n'a présenté le moindre symptôme de tétanos.

Le cheval 4 a reçu une seule injection de 10 cent. cubes d'anatoxine; il a résisté à l'épreuve de l'écharde. Si nous nous référons au titrage de son sérum, nous voyons que celui-ci renferme en effet de l'antitoxine, quoique en plus faible quantité cependant que le précédent. Si le mélange toxine-sérum renfermant une demi-dose mortelle n'a pas donné au cobaye de tétanos local, le mélange renfermant une dose mortelle se révèle encore toxique. Les cobayes qui l'ont reçu ont présenté du tétanos local, tardif et fruste, auquel ils ont d'ailleurs survécu.

Le cheval 6, qui a reçu une injection de 20 cent. cubes d'anatoxine, a présenté, après insertion de l'écharde, un tétanos local, tardif, mais grave, auquel il a succombé. Le caractère de sa maladie dénote cependant une certaine résistance. Ceci est parfaitement confirmé par le titrage de son sérum. Ce sérum renferme certainement de l'antitoxine, mais en quantité beau-

coup plus faible que les deux précédents. L'injection du mélange toxine-sérum renfermant une demi-dose mortelle n'a pas provoqué de tétanos local chez les cobayes qui l'ont reçu; le mélange renfermant une dose mortelle a non seulement provoqué du tétanos local, mais encore amené la mort des cobayes les septième et huitième jours à dater de l'injection, c'est-à-dire avec retard par rapport aux témoins. Cela montre que, si la présence de l'antitoxine est toujours corrélative de l'immunité, elle ne suffit pas à l'assurer, son abondance seule est la raison nécessaire de la résistance conférée. Il faut non seulement de l'antitoxine, mais encore *assez* d'antitoxine.

Le cheval 5 a reçu une seule injection de 10 cent. cubes d'anatoxine. Il est mort de tétanos aigu à la suite de l'épreuve de l'écharde. Or, son sérum ne renfermait pas d'antitoxine, ou il en renfermait si peu qu'elle n'a pu être mise en évidence dans les conditions de notre expérience. Les cobayes, qui ont reçu les mélanges toxine-sérum, renfermant une demie et une dose mortelle, ont présenté des contractures locales et ont succombé dans les mêmes délais que les témoins.

Ainsi, la vaccination antitétanique du cheval par de faibles doses d'anatoxine amène, chez les vaccinés, la formation d'antitoxine. Cette antitoxine peut être non seulement décelée, mais encore titrée, à une certaine période tout au moins. Le titrage sommaire de l'antitoxine nous permet de confirmer nos conclusions antérieures :

L'injection double vaccine efficacement.

L'injection unique vaccine médiocrement.

Les différences individuelles sont considérables.

Le titrage de l'antitoxine apparaît très supérieur à tous les autres procédés d'appréciation de l'immunité. Il permet notamment de faire, entre les animaux, des différences que l'écharde ne permet pas d'apprécier (exemple chevaux 3 et 4). Il n'a, semble-t-il donc, que des avantages, aussi nous pensons que c'est à lui qu'il faut recourir pour apprécier l'immunité dans le cas qui nous occupe.

Du point de vue purement spéculatif, cette expérience suggère quelques réflexions : on a coutume d'admettre, de façon courante, que l'état d'immunité peut exister alors qu'il nous est impossible de déceler, par nos moyens évidemment gros-

siers, la présence de l'anticorps. En ce qui concerne le tétanos, nous pensons qu'il n'y a pas, chez les espèces sensibles, d'immunité activement acquise sans antitoxine humorale aisément décelable. Bien mieux, nous constatons que des quantités appréciables d'antitoxine n'empêchent pas l'organisme, qui a fait les frais de leur production, de rester sensible aux atteintes de la maladie. Cette constatation a d'ailleurs été faite à maintes reprises par ceux qui pratiquent l'hyperimmunisation du cheval. Ils ont pu remarquer, en effet, l'apparition du tétanos local chez des sujets dont l'organisme renferme cependant de l'antitoxine en quantités relativement abondantes.

Toutes les fois que nous avons recherché l'antitoxine chez des animaux vaccinés (cobayes ou chevaux), nous n'avons eu aucune peine à la mettre en évidence lorsque ces sujets possédaient l'immunité.

Aussi retiendrons-nous, pour le moment du moins, les seules modifications humorales comme révélatrices de l'état d'immunité.

#### 4° QUANTITÉ D'ANATOXINE NÉCESSAIRE A L'ÉTABLISSEMENT DE L'IMMUNITÉ.

La vaccination antitétanique du cheval étant établie, pensons-nous, dans son principe, il nous reste à déterminer quelles sont les doses d'anatoxine nécessaires et suffisantes pour produire l'immunité recherchée. Il est évident qu'il y a intérêt, pour rendre le procédé commode et acceptable, à réduire autant que possible le volume d'anatoxine employée.

Nous avons pu, par l'expérience que nous allons rapporter, nous rendre compte que les doses vaccinales peuvent encore être réduites. Nous avons constaté, en outre, une fois de plus, l'infériorité des résultats obtenus par l'injection unique (tout ceci ne valant, bien entendu, que pour l'anatoxine injectée et telle que nous l'avons définie). Ce qui importe, c'est bien plutôt la répétition des injections, que la quantité absolue d'anatoxine injectée :

Neuf chevaux ont été préparés de la façon suivante :

Deux chevaux, 7 et 8, reçoivent une injection de 15 cent. cubes d'anatoxine

Deux chevaux, *9* et *10*, reçoivent une injection de 10 cent. cubes d'anatoxine.

Deux chevaux, *11* et *12*, reçoivent une injection de 5 cent. cubes d'anatoxine.

Trois chevaux, *13*, *14* et *15*, reçoivent chacun deux injections de 5 cent. cubes d'anatoxine, un intervalle de vingt jours ayant été ménagé entre ces deux interventions.

Ces neuf chevaux ont été saignés : *7*, *8*, *9*, *10*, *11* et *12*, cinq semaines après la date à laquelle ils ont été injectés; *13*, *14* et *15*, deux semaines après la deuxième injection. Nous avons, dans les sérums obtenus, recherché la présence de l'antitoxine en opérant de la façon suivante :

Chaque sérum est mélangé, à la dose fixe et uniforme de 3 cent. cubes, à des quantités variables de toxine tétanique : un cinquième, une demie, une, deux doses mortelles. Les mélanges, après trente minutes de contact à la température du laboratoire, sont injectés à des cobayes de 300 grammes. En même temps, des cobayes témoins reçoivent des doses correspondantes de toxine. Ces témoins présentent du tétanos local après quarante-huit heures d'incubation pour un cinquième et une demi-dose mortelle; après vingt-quatre heures, pour une et deux doses mortelles. Chez ces derniers, la mort survient en quatre jours pour deux doses mortelles; en cinq jours pour une dose mortelle.

L'observation des cobayes qui reçoivent les mélanges toxine-sérum montre que l'antitoxine est présente, et en notables quantités, chez les chevaux *13*, *14* et *15*, qui reçurent deux injections de 5 cent. cubes d'anatoxine. Elle fait défaut chez ceux qui ne reçurent qu'une seule injection, quelle que soit la dose d'anatoxine injectée. A peine en trouve-t-on des traces chez deux d'entre eux seulement, *7* et *11*, dont le sérum, à la dose de 3 cent. cubes, ne neutralise qu'un cinquième de dose mortelle. Les sérums *13* et *15*, employés à la même dose, neutralisent complètement une dose mortelle; le mélange renfermant deux doses mortelles est encore toxique et mortel pour le cobaye. 3 cent. cubes du sérum *14* neutralisent parfaitement deux doses mortelles; le mélange injecté au cobaye ne donne même pas de tétanos local.

Nous ne pouvons dire, en l'état de nos recherches, si des doses

encore inférieures d'anatoxine, telles que 2, puis 5 cent. cubes, par exemple, permettraient d'atteindre des résultats satisfaisants. Répétons encore cependant que nos résultats ne valent qu'en fonction du pouvoir antigène de l'anatoxine employée. Tout laisse supposer que des résultats encore plus démonstratifs seraient atteints, si des toxines beaucoup plus actives étaient utilisées dans la préparation des anatoxines.

#### 5° DURÉE DE L'IMMUNITÉ.

On admet que les méthodes courantes de vaccination confèrent, d'une façon générale, une immunité d'une durée pratique d'un an. Il nous est indispensable de rechercher quelle est la durée de l'immunité conférée au cheval par l'anatoxine tétanique. Bien que nous n'ayons pu contrôler si cette immunité va jusqu'à la durée d'un an, nous sommes en mesure cependant d'apporter quelques précisions à ce sujet.

Nous savons déjà, et c'est d'ailleurs là une notion courante, que l'immunité antitétanique est assez lente à apparaître en général. Si certains antigènes provoquent très rapidement l'apparition d'anticorps chez le cheval, si notamment l'anatoxine diphtérique est susceptible, ainsi que l'a montré Ramon (1), d'amener chez le cheval la production de quantités très considérables d'antitoxine en quelques jours, voire même en quelques heures, nous n'avons pu, pour notre part, obtenir rien d'approchant avec l'anatoxine tétanique. Des doses énormes d'anatoxine, allant de 200 à 300 cent. cubes, n'ont pas amené, chez le cheval, la production d'antitoxine décelable avant un délai variant de quinze à dix-sept jours. Aussi, actuellement, et avec les antigènes dont nous disposons, nous pensons que ce temps ne peut guère être réduit. Nous avons noté, au cours de ce travail, que l'immunité peut être constituée chez le cheval en quatorze jours, et qu'elle est satisfaisante en trois semaines, délais qui, nous l'avons fait remarquer, sont sensiblement égaux à ceux que nécessitent les vaccinations courantes comportant deux interventions. Cette immunité déjà solide en quelques jours semble, si nous nous en rapportons

(1) RAMON. *Ces Annales*, 39, p. 3.

à des expériences faites sur le cobaye, s'accroître en fonction du temps. C'est ainsi que, chez les sujets de cette espèce, elle ne cesse de se renforcer pendant trois mois au moins après une injection d'anatoxine.

La lenteur avec laquelle s'établit, puis s'accroît l'immunité contre le tétanos permet d'espérer qu'elle n'est pas inférieure, en durée, à celle que déterminent les vaccinations couramment pratiquées.

Considérons trois chevaux, 13, 14 et 15, qui ont fait l'objet d'une étude antérieure. Ces trois sujets avaient, deux semaines après la deuxième injection d'anatoxine, des quantités notables d'antitoxine dans leur sérum. Actuellement, après plus de quatre mois, les propriétés antitoxiques de leur sérum ne se sont aucunement affaiblies.

Antérieurement déjà, nous avons pu nous rendre compte que des chevaux, qui avaient, dans le même délai de quatre mois, résisté à l'épreuve de l'écharde, présentaient concurremment de l'antitoxine dans leur sérum. Tous les survivants de cette expérience ont été conservés. Actuellement, après plus de huit mois, leur sérum se révèle encore nettement antitoxique. Nous ne pouvons toutefois faire fond sur cette dernière expérience, elle ne peut être acceptée que sous réserves. Ces chevaux, en effet, ont tous été éprouvés par une écharde, et cette épreuve est, nous l'avons fait remarquer, de nature à modifier leur état humoral. L'écharde a pu contribuer à accroître, ou tout au moins à entretenir leur immunité. Nous espérons cependant que le temps nous permettra de poser les conclusions que nous ne sommes pas en mesure d'apporter aujourd'hui en ce qui concerne la durée de l'immunité.

Ces recherches, encore à leur début, nous portent à penser que la vaccination antitétanique active du cheval par l'anatoxine et éventuellement celle de certaines autres espèces domestiques, pourront entrer dans le domaine pratique de la prophylaxie du tétanos. Nous nous efforcerons, en ce qui nous concerne, d'en préciser la technique, les indications et les avantages. Seuls de larges essais, que nous nous proposons de réaliser, nous permettront de mener à bien une telle entreprise.

## BIBLIOGRAPHIE

OKUDA. *Jour. Japan. Soc. Veter. Science*, mars 1923.

LÖWENSTEIN. *Zeit. f. Hyg. und Inf.*, **61**.

V. EISLER. *Wiener klin. Woch.*, 1915, p. 1224.

RAMON. *C. R. Soc. Biol.*, **86**, 1922, [p. 661, 711, 813; **89**, 1923, p. 2. *C. R. Acad. des Sc.*, **157**, 1923, p. 1338; **158**, 1924, p. 1436; **159**, 1924, p. 422 et 485.

*Ces Annales*, **37**, 1923, p. 1001; **38**, 1924, p. 1; **39**, 1925, p. 1.

DESCOMBEY. *C. R. Soc. Biol.*, **91**, 1924, p. 239; **92**, 1925, p. 482.

# RECHERCHES SUR LES COCCIDIES ET LES COCCIDIOSES DU LAPIN <sup>(1)</sup>

par Ch. PÉRARD.

(*Institut Pasteur, Laboratoire de Protozoologie.*)

## II. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA BIOLOGIE DES OOCYSTES DE COCCIDIES

Les coccidioses naturelles sont très répandues. A peu près tous les jeunes lapins et la plupart des adultes sont porteurs de kystes qui, après évolution dans le milieu extérieur, assurent l'infection des lapereaux neufs. L'infection s'entretient dans les clapiers, et l'on assiste, de temps à autre, à de véritables épi-zooties qui entraînent la mort de portées entières, et finissent par ruiner les élevages.

Après avoir étudié ces maladies et leurs agents, il m'a paru utile de rechercher quels sont les meilleurs moyens à employer pour les éviter. On sait comment se présente le problème. Il consiste à briser en un point quelconque le cercle de l'évolution des parasites. Ce cycle se divise en deux phases : une phase interne, dans les tissus de l'animal sensible chez lequel le parasite produit la maladie (schizogonie aboutissant à la gamogonie); une phase externe (sporogonie) pendant laquelle le parasite est accessible sous sa forme d'oocyste.

Quel est le moment le plus favorable pour détruire le parasite? On pourrait croire que celui-ci est plus fragile et plus facile à atteindre dans le corps du malade quand il n'est protégé que par l'enveloppe des cellules épithéliales parasitées, ou quand, au moment de la désagrégation du schizonte, le jeune mérozoïte nu, à la recherche d'une nouvelle cellule à parasiter,

(1) La première partie de ce travail, dont l'ensemble a constitué une *Thèse pour le Doctorat vétérinaire*, soutenue le 4 avril 1923 devant la Faculté de Médecine de Paris, a paru dans ces *Annales*, 38, novembre 1924, p. 953.

se trouve pendant quelques instants sans protection dans la lumière d'un canal (intestin ou conduits biliaires). Il n'en est rien. Tous les auteurs sont d'accord sur le peu d'efficacité des « traitements » destinés à tuer le parasite *in vivo*. Les médicaments, du moins ceux préconisés jusqu'à ce jour, semblent bien plutôt agir sur les tissus de l'hôte comme toniques ou astringents, que comme parasitocides. L'expérience montre que, même dans les infections expérimentales souvent massives, on obtient de bien meilleurs résultats par l'emploi de précautions hygiéniques destinées à empêcher les surinfections au cours de l'évolution de la maladie, qu'en administrant des médicaments.

Pour que la prophylaxie soit efficace, il faut qu'elle repose sur une connaissance suffisante de la biologie des coccidies dans le milieu extérieur et de la valeur des moyens de destruction des oocystes. On sait comment évoluent les oocystes dans le milieu extérieur. On sait aussi que, pour que la segmentation se produise, il faut à l'oocyste de l'humidité, de la chaleur et une aération convenables. Mais, sur un certain nombre de points, nos connaissances sont encore imprécises. C'est ainsi que certains auteurs indiquent comme possible la contamination par les poussières d'excréments parasités desséchés; que, au sujet de la destruction des oocystes, d'autres recommandent la désinfection à l'acide sulfurique dilué ou à l'acide phénique, et le sulfatage des pâturages.

Nous verrons, au cours de la présente étude, qui a pour but de préciser certains points de la biologie des coccidies servant de base à la prophylaxie des coccidioses, que ces notions sont erronées.

#### A. — ETUDE DES CONDITIONS NÉCESSAIRES A LA SPORULATION.

On sait que pour être infectants les oocystes doivent être complètement segmentés, c'est-à-dire contenir des sporozoïtes. Cette segmentation demande, pour s'effectuer, un temps plus ou moins long suivant l'espèce et aussi suivant le milieu et les conditions dans lesquelles se trouvent les oocystes. Il y a là une « phase négative » dont il est important de préciser la *durée*, car, pendant toute cette phase, des excréments contaminés pourront rester au contact d'animaux sensibles sans les

infecter ou les surinfecter. Si l'on a soin de retirer ces excréments (ou les animaux) avant la formation des sporozoïtes, on évitera l'infection.

Nos connaissances sur la durée de la segmentation des oocystes manquent de précision. D'après Leuckart, la durée de la période d'incubation de la coccidie du foie et de celle de l'intestin serait très différente. L'évolution d'*E. perforans* demanderait à peine autant de jours que celle d'*E. stiedæ* exige de semaines, c'est-à-dire qu'elle serait environ sept fois plus rapide. Rieck a constaté au contraire que cette prétendue différence est fort peu appréciable. C'est également l'avis de Railliet et Lucet (1891).

Dans un récent travail, Reichenow (1921) estime que, sans être aussi considérable que l'avait indiqué Leuckart, la différence de la durée de la sporulation des deux espèces de coccidies du lapin est cependant appréciable. D'après lui, dans les conditions les plus favorables, la sporulation se termine chez *E. perforans* en quarante-huit heures et chez *E. stiedæ* en soixante-dix heures.

Pour étudier les conditions qui peuvent influer sur la sporulation (température, humidité, aération, fermentations), je me suis servi de différentes espèces d'oocystes d'animaux coccidiés. Ces expériences parallèles ont porté sur *E. perforans* et *E. stiedæ* du lapin, et pour quelques-unes sur *E. falciiformis* de la souris.

Les excréments fraîchement émis — matières diarrhéiques ou crottes — que l'on écrasait pour l'emploi (1) étaient étalés en couche mince dans une boîte de Petri sur du papier filtre, recouverts d'environ 5 millimètres d'une solution d'acide chromique à 1 p. 100 et maintenus en chambre humide pendant toute la durée de l'expérience. Pour *E. stiedæ*, j'ai utilisé à la

(1) Quand on opère avec des crottes, quelle que soit l'espèce d'oocyste en cause, il convient d'éviter une cause d'erreur qui peut expliquer, pour une part, les différences dans la durée de la sporulation observées par certains auteurs pour un même parasite. Si l'on se borne à prélever les crottes, même fraîches en apparence, dans la cage de l'animal, on peut recueillir des excréments émis depuis plusieurs heures, et on manque de base précise pour le point de départ de la segmentation. Il est indispensable de n'employer que des crottes fraîchement émises. Pour le lapin, il est généralement facile de se procurer une crotte fraîche par pression du rectum. Pour la souris, on place l'animal sur une feuille de papier, sous un couvercle grillagé, jusqu'à ce que l'on assiste à une défécation.

fois des crottes et du contenu de vésicule biliaire de lapins morts de coccidiose hépatique, ce qui m'a permis de constater que les oocystes prélevés dans la vésicule biliaire se comportent de la même façon que ceux de même espèce éliminés avec les excréments. Par conséquent, le séjour prolongé des oocystes d'*E. stiedæ* dans l'intestin de l'hôte n'ajoute rien aux propriétés qu'ils possèdent dès leur déversement dans le duodénum. Mais il y a, parmi les oocystes prélevés directement dans la bile, généralement extrêmement nombreux, un pourcentage assez élevé (au moins 1/4) de parasites qui ne se développent pas et que l'on reconnaît à ce qu'ils se sont laissé pénétrer par l'acide chromique, alors que cette proportion est plus faible pour les oocystes contenus dans les excréments dans la période d'état des infections coccidiennes.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE. — Quelques expériences typiques au sujet de l'influence de la température sur la durée de la segmentation ont été résumées dans le tableau III. Les états de la segmentation à différents moments indiqués dans chaque colonne sont les stades les plus avancés observés, même parfois dans un seul oocyste, au moment de l'examen microscopique des cultures; ils ne signifient pas que tous les oocystes étaient au stade indiqué. Ce qui importe, en effet, c'est de connaître le temps minimum que peut mettre un oocyste à donner des sporozoïtes, dans les conditions les plus favorables, à une température déterminée.

On peut remarquer qu'à 0° C. les oocystes ne se segmentent pas. J'ai laissé à cette température des oocystes d'*E. perforans* pendant un mois sans qu'ils aient subi des modifications. Ils n'étaient pas morts puisque, placés ensuite en chambre humide à 25°, ils se sont segmentés en trente-six heures comme des parasites frais.

Pour les températures plus élevées, jusqu'à 38° C., l'influence de la température est très nette. A la glacière (5-6°) la segmentation commence pour les trois espèces vers le quatrième et cinquième jour (aspect polyédrique de la boule protoplasmique centrale). On aperçoit des sporozoïtes à partir de la fin de la deuxième semaine.

A la température du laboratoire (18-20°), quelques oocystes

TABLEAU III. — Influence de la température sur la rapidité de la segmentation des oocystes.

	TEMPÉRATURE en degrés	18 heures	24 heures	30 heures	36 heures	48 heures	60 heures	72 heures	7 jours	14 jours	21 jours	30 jours
		0-2 5-6 15-6 48 25 38 40	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0
<i>E. perfolans</i>	0-2 5-6 15-6 48 25 38 40	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0
<i>E. stiedae</i>	0-2 5-6 15-6 48 25 38 40	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0
<i>E. falciformis</i>	0-2 5-6 15-6 48 25 38 40	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0	0 0 0 Sporoblastes Sporocystes 0

(1) Les oocystes sont vivants.

(2) Mis à 18° les oocystes ne se segmentent plus.

(3) Les oocystes sont vivants.

(4) Les oocystes restent capables de se segmenter à 20°.

(5) Oocystes vivants.

d'*E. perforans* sont mûrs au bout de quarante-huit heures. Pour *E. stiedæ* et *falciformis*, on n'aperçoit des sporozoïtes qu'au bout de trois jours (soixante-douze heures).

A 25° il y a quelques oocystes d'*E. perforans* mûrs au bout de trente heures; ce sont, en général, les plus petits qui ne montraient pas de micropyle apparent; ceux d'*E. falciformis* sont mûrs au bout de quarante-huit heures et, pour *E. stiedæ*, la segmentation est terminée pour quelques-uns à la soixantième heure.

A 38° des oocystes d'*E. perforans* et *falciformis* contiennent également des sporozoïtes au bout de trente heures. Ceux d'*E. stiedæ* ne se segmentent plus à cette température.

En résumé, la température favorable à la segmentation va de 2° à 38°. L'optimum semble se trouver entre 25° et 30° C.

La différence de durée de la segmentation des oocystes d'*E. perforans* et d'*E. stiedæ* est donc nette et peut servir de caractère distinctif des deux espèces ainsi que l'ont indiqué Leuckart (1871) et Reichenow (1921). D'après mes expériences, dans les conditions les plus favorables, un certain nombre de petites formes d'*E. perforans* sont complètement segmentées au bout de trente heures, tandis que pour *E. stiedæ* les sporozoïtes ne sont formés qu'à la soixantième heure.

La sporulation des grandes formes d'oocystes d'*E. perforans* à micropyle le plus souvent ouvert (fig. 4) est plus lente que celle des petites formes; sa durée est d'environ quarante-huit heures à 25° C.

Cette différence fournit, en outre, un autre moyen de séparer les espèces d'oocystes dans les infections mixtes. Si l'on donne à de jeunes lapins neufs des cultures en acide chromique âgées de trente à quarante-huit heures, seule l'espèce *E. perforans* se développera.

C'est à 38° que le temps de segmentation est le plus court pour *E. perforans*; mais, si l'on continue à observer les oocystes, on constate que la segmentation n'est pas générale; une assez forte proportion n'arrive pas à maturité et, après le troisième jour, la segmentation semble s'arrêter. Les sporocystes deviennent sphériques et se rétractent; ils s'entourent d'une membrane à double contour, épaisse, et leur contenu ne se différencie pas en sporozoïtes. Cet état de souffrance s'accroît de

jour en jour; un grand nombre d'oocystes meurent et sont pénétrés par l'acide chromique. Si l'on retire ces cultures de l'étuve pour les mettre à la température du laboratoire, on constate que la segmentation est définitivement arrêtée. D'autre part, si l'on met des oocystes frais à 40°, on s'aperçoit les jours suivants qu'ils ne se segmentent pas et qu'ils sont tués par la chaleur. La limite de la vitalité des oocystes est donc légèrement supérieure à 38° pour *E. perforans* et légèrement inférieure pour *E. stiedæ*.

Certains auteurs, pour expliquer la non-sporulation des oocystes dans le tube digestif de l'hôte mammifère, ont pensé que la température de ces animaux (37-38°) s'opposait à la segmentation. Le fait que les oocystes d'*E. perforans* peuvent se segmenter à l'étuve à 38° montre que cette opinion est erronée.

On peut objecter que la durée du séjour des oocystes dans l'intestin n'est peut-être pas suffisante pour que la segmentation ait le temps de se produire.

L'expérience suivante permet d'éliminer également cette hypothèse. On suture l'anus d'un jeune lapin infecté de coccidiose intestinale et dont les crottes contiennent de nombreux oocystes. Ce lapin meurt au bout de quarante heures. S'il n'y avait qu'une question de température en jeu, on devrait, à ce moment, trouver des oocystes déjà segmentés dans les excréments arrêtés dans le rectum, puisque ceux-ci ont séjourné dans la dernière portion du tube digestif, aux environs de 38°, plus de trente heures. L'examen de ces excréments montre qu'il n'y a dans ces oocystes aucune trace de segmentation. D'autre part, ceux-ci ne sont pas morts puisqu'ils se segmentent à 20°. On peut donc dire que ce n'est pas la température qui empêche la sporulation dans le tube digestif de l'hôte vivant. Nous verrons plus loin que cette non-segmentation peut être attribuée à l'absence d'oxygène libre.

INFLUENCE DE L'HUMIDITÉ. — Si on abandonne dans le laboratoire à 16-18° une crotte entière sur une feuille sèche de buvard, au bout de trois jours il n'y a plus trace d'oocystes vivants. Ceux-ci se sont desséchés, déformés, plissés; finalement leurs parois se sont déchirées et on reconnaît à peine leurs cadavres.

Les résultats sont identiques, quelle que soit l'espèce d'ocyste employée.

Par contre, nous avons vu que, toutes choses égales, en chambre humide, les oocystes contenus dans une crotte sont, dans le même temps, à peu près tous arrivés au stade sporocyste et que quelques-uns contiennent même des sporozoïtes.

L'humidité est donc nécessaire pour que l'ocyste puisse continuer son évolution dans des conditions de température semblables à celles pouvant exister dans la nature.

On peut encore mettre en évidence la nécessité d'un milieu aqueux pour les oocystes en soumettant ceux-ci à l'action de

TABLEAU IV. — Influence de l'humidité sur les oocystes.

[Pourcentage d'ocystes morts dans les excréments privés d'eau (de 15 à 38° C.).]

TEMPÉRATURE en degrés	1 HEURE	2 HEURES	6 HEURES	12 HEURES	18 HEURES	24 HEURES	48 HEURES
15-16 (1)						10	25
20 (2)						75	100
25			10 à 60 (3)		90	100	
30	100 (4)			100			
38	50 (5)	75 (5)	100				

(1) Dans une pièce non chauffée.  
 (2) Dans une pièce chauffée.  
 (3) Suivant l'état d'humidité initial des excréments.  
 (4) Dans un courant d'air et au soleil.  
 (5) Les oocystes restants, même déformés, sont encore capables de se segmenter dans l'acide chromique à 20° C.

substances avides d'eau telles que l'alcool absolu, les cristaux de chlorure de sodium, de chlorure de calcium, la glycérine. Au bout d'un temps variant de vingt-quatre heures à quatre jours, tous les oocystes sont déformés, rétractés ou éclatés. Ils sont incapables de se segmenter dans les milieux favorables. Ils ont donc été tués par la déshydratation.

A partir de quel moment les oocystes soumis à la dessiccation cessent-ils de se segmenter?

Il y a lieu de tenir compte de l'état hygrométrique de l'air et de la température ambiante.

Si on place à 15° des crottes écrasées, riches en oocystes, dans un appareil à dessécher contenant de l'acide sulfurique pour absorber l'humidité, on constate qu'au bout de deux heures les parois des oocystes commencent à se rétracter; leur surface est irrégulière, plus ou moins plissée.

Les mêmes oocystes laissés pendant dix-huit heures dans l'atmosphère dépourvue d'humidité de l'appareil à dessécher étaient tous morts; on n'a retrouvé que quelques cadavres à parois très rétractées, le plus souvent déchirés et vides.

Le tableau IV ci-dessus résume quelques autres expériences sur le même sujet. On voit que, à 15-16°, dans un local clos, la dessiccation est très lente: les oocystes ont le temps de se segmenter. Au contraire, à partir de 20°, en milieu sec, la sporulation des oocystes est impossible: ils sont altérés et détruits avant de se segmenter (1).

Il peut y avoir des différences assez sensibles, suivant l'état d'humidité initial des excréments et suivant que ceux-ci sont ou non exposés directement au soleil ou dans un courant d'air. Dans une expérience où les excréments diarrhéiques avaient été étalés en couche mince (1/2 millimètre environ) sur papier filtre et exposés dans un courant d'air, au soleil, par temps sec, tous les oocystes étaient détruits en une heure. Dans ce cas, l'évaporation a été accélérée par l'action du vent.

Dans les conditions naturelles, l'humidité nécessaire aux oocystes se trouve dans les excréments mêmes qui sont très souvent ramollis ou diarrhéiques. Lorsque les crottes sont dures, j'ai montré dans la première partie de ce travail que la déshydratation des malades se fait par le moyen de l'excrétion urinaire, les animaux étant atteints de polyurie. Les excré-

(1) Dans toutes ces expériences, la mort des oocystes a été contrôlée par des essais de culture sur acide chromique en chambre humide à 20°. Il est facile d'improviser des chambres humides de grande capacité. On retourne dans un cristalliseur contenant une mince couche d'eau un bocal à saignée de 2 litres, sous lequel on empile les boîtes de Petri comme des pièces de monnaie.

ments répandus dans les litières sont ainsi fréquemment et abondamment remis dans des conditions d'humidité et de chaleur très favorables à une segmentation rapide (1). S'il leur arrive d'être privés d'humidité, ils ne peuvent se segmenter et sont tués par la dessiccation.

INFLUENCE DE L'AÉRATION. — Balbiani pensait que les variations dans la durée de la sporulation observées par Leuckart pour *Coc. oviforme* et *C. perforans* tenaient à l'épaisseur plus ou moins grande de la couche d'eau qui recouvrait les kystes en incubation. Sous une couche d'eau de 2 à 3 centimètres, il a vu la segmentation de la coccidie du foie se produire après quinze ou vingt jours; sous une couche plus mince ou dans le sable humide, elle survenait en deux ou trois jours, et l'évolution complète était terminée dans l'espace de dix à quinze jours en été. Cette opinion était partagée par Railliet et Lucet.

De même, Metzner (1903) attire l'attention sur la nécessité d'une bonne aération pour avoir une évolution sporogonique rapide. Celle-ci a lieu en soixante heures, dans des conditions favorables pour *Coccidium cuniculi*. (On sait que cet auteur croyait à l'identité des deux espèces et réunissait sous ce nom les deux parasites du lapin.) Si l'aération est mauvaise, ou bien si on place les kystes dans l'acide carbonique, l'évolution est retardée et peut même devenir impossible.

J'ai refait l'expérience de Balbiani en employant un tube à essai et une boîte de Petri pour obtenir des cultures d'ocystes en profondeur et en surface et j'ai constaté l'exactitude des faits annoncés.

Il est aisé de mettre en évidence la nécessité de l'air pour la segmentation. Si l'on met en culture des portions de rectum ligaturées aux deux extrémités et contenant des crottes coccidiées, on constate que les coccidies ne se segmentent pas.

On peut observer aussi qu'en ampoules scellées les ocystes n'évoluent pas : le contenu fluide du gros intestin d'un lapin mort de coccidiose intestinale expérimentale est aspiré dans une pipette que l'on scelle à la flamme de façon à réaliser des ampoules de verre bien pleines de matières fécales. Ces am-

(1) Les ocystes se segmentent très bien dans l'urine fraîche.

poules sont conservées à 18°. Elles sont ouvertes au bout de huit, quatorze, vingt et un jours. On n'observe aucune segmentation. Les oocystes paraissent être en bon état et leur nombre n'a pas diminué. Placés sur acide chromique, ils se segmentent tous en quelques jours.

Les résultats sont les mêmes si, avant la mise en ampoules, les excréments sont mélangés à deux parties d'eau longuement bouillie pour en chasser l'air dissous. Au bout de dix jours, les oocystes n'ont pas commencé à se segmenter. Ils sont en bon état et vivants, comme le montre leur évolution ultérieure dans l'acide chromique.

De même si on recouvre entièrement des crottes fraîches, riches en oocystes, d'une mince couche de paraffine, on n'observe les dix jours suivants, en examinant une crotte chaque jour, aucun commencement de segmentation, alors que des crottes-témoins mises dans des conditions habituelles de culture ont achevé leur évolution sporogonique. De même, si on place les excréments dans un récipient dont l'air a été remplacé par du gaz d'éclairage, on n'observe pas de segmentation au bout de dix jours bien que les oocystes soient encore vivants.

Il ressort de ces expériences que l'air (il serait sans doute plus exact de dire l'oxygène) est nécessaire pour que les oocystes puissent accomplir leur évolution sporogonique. Mais comment agit l'oxygène? Sur l'oocyste lui-même ou bien sur le milieu de culture en empêchant ou contrariant le développement des bactéries anaérobies de l'intestin qui accompagnent les oocystes dans les excréments? C'est cette dernière hypothèse qui me paraît le plus probable.

En effet, si, dans l'expérience semblable à celle de Balbiani, on remplace dans le tube à essai et la boîte de Petri l'eau ordinaire par une solution à 1 p. 100 d'acide chromique dans cette même eau, on constate que les résultats sont différents : la rapidité de la segmentation dans les deux récipients est sensiblement égale, quelle que soit l'épaisseur du liquide qui recouvre les oocystes. Et pourtant, la quantité d'oxygène dissous dans le tube à essai n'a pas été augmentée. On a simplement ajouté un produit qui a joué le rôle d'antiseptique pour les bactéries, mais non, comme nous le verrons plus loin, pour les oocystes.

Il est aisé de montrer que le développement des cultures bactériennes empêche la segmentation des oocystes. Si on place des excréments parasités, dans des tubes de bouillon ordinaire, de bouillon sous vaseline, de bouillon légèrement acide sous vaseline, de gélatine, et dans des tubes témoins d'acide chromique à 1 p. 100 sous vaseline, que l'on mette ces milieux à 25° pour favoriser le développement des bactéries de l'intestin, on constate qu'au bout de deux, quatre, sept, quatorze, vingt et un jours, les cultures bactériennes sont abondantes et qu'aucun oocyste ne se segmente. Dans les tubes témoins, au contraire, des oocystes (*E. perforans*) sont trouvés segmentés dès le deuxième jour. On observe en outre un autre fait intéressant : si, à la fin de l'expérience, on éprouve la vitalité des oocystes contenus dans les cultures bactériennes, on constate qu'ils sont morts.

On peut donc dire que la multiplication des bactéries empêche la segmentation. La réaction n'est pas à incriminer, bien qu'elle soit devenue alcaline dans tous les milieux où les oocystes n'ont pas évolué. Cette réaction doit être considérée comme la *conséquence* de la pullulation des bactéries apportées avec les excréments. Et ce qui prouve que le sens de la réaction est sans action sur les oocystes, c'est que l'on peut faire segmenter ceux-ci dans une solution étendue de soude presque aussi bien que dans un milieu acide.

ACTION DE LA PUTRÉFACTION. — Les expériences ci-dessus vont nous aider à comprendre ce qui se passe dans une fermentation anaérobie intéressante à considérer, la putréfaction.

Si on laisse se putréfier à diverses températures des intestins de lapins coccidiés, on observe que : à 5° (glacière) la putréfaction s'opère lentement, et pendant tout le temps que les oocystes sont maintenus dans ces conditions ils ne présentent pas la moindre ébauche de segmentation. Au début, à peu près tous les oocystes sont vivants. A mesure que la putréfaction augmente, la proportion d'oocystes vivants diminue, et, au bout d'un mois, ils sont à peu près tous morts.

A 25° le développement des bactéries de la putréfaction est beaucoup plus rapide et, en examinant les oocystes que contient le gros intestin, on s'aperçoit que, comme dans la première

expérience, le nombre de ceux qui ne se développent pas est proportionnel à l'intensité de la putréfaction, et au bout de dix jours il n'en reste plus un seul de vivant à condition que l'intestin n'ait pas été ouvert. (Dans les matières qui se sont écoulées de l'intestin, quelques petits oocystes d'*E. perforans* peuvent se segmenter.)

De même, si on laisse des cadavres entiers de lapins coccidiés se putréfier à 18-20°, on constate, au bout de quatorze jours, qu'aucun oocyste contenu dans le tube digestif ne s'est segmenté. (Les oocystes témoins provenant de crottes du même animal recueillies avant la mort se sont segmentés en quarante-huit heures.)

Si on essaie de cultiver ces oocystes, provenant de milieux putréfiés, dans les milieux usuels, on constate qu'ils sont morts. Or, nous avons vu que, dans un même temps, l'anaérobiose seule empêche la segmentation des oocystes, mais ne les tue pas. Il y a donc eu, dans les expériences ci-dessus, un facteur de mort qui est apporté par les abondantes cultures bactériennes et qui ne se développe pas dans les tubes d'acide chromique quelle que soit l'épaisseur de la couche de liquide employée, que ce liquide soit ou non recouvert d'une couche d'huile de vaseline. Ce facteur, qui peut, suivant sa quantité et la durée de son action, retarder la segmentation ou amener la mort des oocystes, est vraisemblablement constitué par les produits de déchets solubles et toxiques des cultures bactériennes ou de la putréfaction. Il pénétrerait par osmose dans les oocystes, au niveau du micropyle où il n'existe, quand celui-ci est ouvert, qu'une mince membrane retenant le contenu de la cellule. Cette hypothèse est renforcée par le fait que ce sont les petites formes d'*E. perforans*, dont le micropyle est le plus souvent fermé ou peu apparent, qui résistent le plus longtemps dans les cultures et dans les milieux en putréfaction, et qui, dans les expériences sur la vitalité, se segmentent les premières. On peut remarquer, aussi, que les oocystes morts de cette façon sont gonflés, élargis, et que les parois ne touchent plus l'équateur de la boule protoplasmique devenue libre à l'intérieur du kyste.

ACTION DE LA LUMIÈRE. — Les oocystes se segmentent aussi

bien, aussi vite, et en aussi grand nombre dans l'obscurité qu'à la lumière.

#### B. — CONSERVATION DES OOCYSTES.

On sait que les oocystes expulsés avec les excréments ne tardent pas à donner des spores. Ils trouvent, en effet, à la surface des litières et du fumier des conditions de température, d'humidité et d'aération favorables à leur segmentation sans qu'il soit nécessaire, comme on l'a cru, qu'ils séjournent dans l'eau. C'est donc presque toujours sous la forme d'oocyste sporulé, c'est-à-dire prêt à donner l'infection, que se fait la conservation du parasite. Il n'y a d'exception que lorsque les oocystes sont privés d'air, ou soumis à la putréfaction, ou lorsque la température extérieure est trop basse. Les deux premières conditions sont réalisées lorsque l'on jette à la surface des fumiers les intestins de lapins coccidiés ou des cadavres entiers d'animaux morts de coccidiose. Nous avons vu que, dans ces conditions, les oocystes se conservent sous la forme non segmentée, mais cette conservation est de courte durée : de quelques jours (à 25°) à un mois environ (2 à 5°) suivant la température et la rapidité de la putréfaction. Si dans cet intervalle de temps le contenu intestinal de ces animaux est mis à jour, la segmentation se produit. Passé ces délais, les oocystes meurent. De même, quand la température extérieure est voisine de 0°, les oocystes ne se segmentent pas. Ils restent en état de vie latente pendant un temps certainement supérieur à deux mois et probablement très grand à condition de se trouver en milieu humide. Mais dans la nature ces conditions de température ne se trouvent réalisées que pendant la saison d'hiver, et c'est sous la forme d'oocystes mûrs que se fait d'ordinaire la conservation.

La limite du temps pendant lequel les oocystes mûrs conservent leur vitalité n'est pas fixée, mais elle est certainement supérieure à une année. Notons simplement que Nöller et ses collaborateurs (1922) ont constaté que des oocystes de la coccidie du mouton conservés en milieu humide sont infectants au bout de huit mois et demi. J'ai moi-même conservé des oocystes d'*E. falciformis* pendant quatorze mois. Je possède

en chambre humide des oocystes des deux espèces de coccidies du lapin segmentés depuis onze mois, et rien ne fait prévoir qu'ils soient à la limite de leur conservation.

Les conditions d'une bonne conservation sont : *a*) l'humidité suffisante et constante, obtenue en plaçant les oocystes sous une mince couche de liquide dont on évite l'évaporation par l'emploi d'une chambre humide; *b*) une température peu élevée, toujours inférieure à 38° C. (celle du laboratoire par exemple); *c*) un milieu non nutritif ou défavorable à la culture des germes bactériens dont les produits de déchets intoxiquent à la longue les oocystes. Cette condition est réalisée expérimentalement par l'emploi des antiseptiques divers qui servent de « milieu » à la culture des oocystes.

\*  
\* \*

On peut remarquer que, dans les expériences précédentes, j'ai dû faire fréquemment une distinction entre les formes classiques d'*E. perforans* et les *grandes formes* de ce même parasite (fig. III, n° 1 et fig. IV) que l'on trouve parfois en majorité dans certaines infections. Ces grandes formes sont moins résistantes et la durée de leur évolution sporogonique est intermédiaire entre celle d'*E. perforans* et celle d'*E. stiedæ*. Si on ne considérait que l'aspect des oocystes dans les excréments fraîchement émis, on pourrait les confondre avec ceux d'*E. stiedæ*, et cette confusion a dû se produire fréquemment. Leur taille, qui est en moyenne de 35  $\mu$  sur 24, peut atteindre celle des oocystes d'*E. stiedæ*; comme ces derniers, ils sont le plus souvent colorés en jaune-orange et on trouve une proportion aussi grande de formes dont le micropyle est largement ouvert. Mais ils possèdent les deux caractères de valeur absolue qui permettent de les rattacher à *E. perforans* : présence après sporulation d'un reliquat de segmentation libre; production exclusive de lésions intestinales.

Il est probable que cette forme est celle vue par E. A. Bruce (1919) en Colombie britannique. S'agit-il d'une nouvelle espèce comme le croit cet auteur? Je la considère plutôt comme une simple variété, dérivée d'*E. perforans* dans des conditions indéterminées, peut-être à la suite de la féconda-

tion, dans certaines infections mixtes, de macrogamètes d'*E. perforans* par des microgamètes d'*E. stiedæ*.

En effet, après avoir eu de nombreuses infections intestinales dans lesquelles je ne trouvais que les formes classiques d'*E. perforans* (petite taille, incolores et à micropyle non ou peu apparent), j'ai vu apparaître un nombre de plus en plus grand de formes de grande taille, à micropyle ouvert et colorées. Au surplus, il est possible que la coloration et la faible résistance des oocystes soit liée à l'ouverture du micropyle. Je propose de donner à ces grandes formes le nom d'*E. perforans var. magna*, et de caractériser cette variété de la façon suivante : « Oocystes de 28 à 40  $\mu$  sur 20 à 26  $\mu$ , à micropyle le plus souvent largement ouvert, fréquemment colorés en jaune-orange; possédant après segmentation un reliquat volumineux, sphérique de 8 à 10  $\mu$  de diamètre, libre parmi les sporocystes qui contiennent aussi un petit reliquat de même nature (fig. IV, n° 5) ».

L'existence de cette forme est intéressante à connaître, parce qu'il est vraisemblable qu'elle a été la cause de confusions dans la détermination des espèces d'oocystes.

### III. — DESTRUCTION DES OOCYSTES

Les oocystes des coccidies représentent la forme de résistance dans le milieu extérieur et la forme d'infection du parasite. Leur destruction présente donc un grand intérêt pratique et il est important de connaître quels sont les meilleurs agents destructeurs.

Les travailleurs qui ont essayé de colorer ces organismes par les méthodes cytologiques modernes connaissent les difficultés que l'on éprouve à faire traverser leurs parois aux fixateurs et à les colorer sous leur forme non segmentée. Quand on fixe au liquide de Bouin (acide picrique, formol, acide acétique), pendant quelques heures, des oocystes étalés en frottis humides et que l'on poursuit la coloration par la méthode classique de l'hématoxyline ferrique, on est surpris, au moment de la différenciation, de constater que la plupart des oocystes sont sortis vivants du fixateur et qu'ils se sont segmentés dans les temps suivants de la coloration. M. Mesnil avait déjà fait la

même remarque pour des fixateurs à base de sublimé. On sait en outre qu'ils se segmentent dans l'acide chromique, l'acide phénique (Baranski, 1879), le formol, le bichromate de potasse et certaines substances colorantes telles que le bleu de méthylène et la safranine (v. Wasielewski, 1904), dans l'acide sulfurique (Galli-Valerio, 1919).

Cette très grande résistance des oocystes aux produits chimiques ne semble pas avoir suffisamment retenu l'attention des auteurs qui, à propos de la désinfection dans les coccidioses, recommandent l'emploi de substances désinfectantes totalement dépourvues d'action nocive sur les oocystes.

J'étudierai successivement l'action des *substances chimiques* et celle des *agents physiques*.

Dans les deux cas, j'ai fait agir les agents, pendant des temps variés, sur des oocystes non segmentés; après quoi, pour juger du résultat, ces oocystes sont placés dans des conditions leur permettant de « mûrir ». Ceux qui continuent leur évolution sporogonique sont restés évidemment vivants. Ceux qui, après plusieurs jours de « culture », ne montrent aucune trace de segmentation peuvent être considérés comme morts (1).

#### A. — SUBSTANCES CHIMIQUES.

Les substances chimiques, dont l'étude présente de l'intérêt au point de vue de leur action sur les oocystes, soit parce que ce sont des antiseptiques puissants, soit parce qu'elles sont recommandées comme désinfectantes dans les coccidioses, ont été classées dans le tableau V.

L'examen de ce tableau montre leur peu d'action sur les oocystes. Ceux-ci accomplissent leur évolution sporogonique après *plusieurs jours* de contact dans les solutions de permanganate de potasse à 1 p. 1.000, de formol à 5 p. 100, d'acide phénique à 5 p. 100, de sublimé à 1 p. 1.000, d'eau de Javel 8° à 20 p. 100, de sulfate de fer à 5 p. 100, de sulfate de cuivre à 5 p. 100, d'acide sulfurique à 10 p. 1.000, d'acide azotique à

(1) La plupart des expériences ont été faites avec *E. perforans*. Quand il s'agit d'*E. stiedæ* le nom de ce parasite est indiqué en abrégé (*E. st.*).

TABLEAU V. — Action des substances chimiques sur les oocystes (1).

	1 HEURE	2 HEURES	6 HEURES	12 HEURES	24 HEURES	36 HEURES	3 JOURS
Permanganate de K (1 p. 1.000) . . . . .	+						+
Formol (5 p. 100) . . . . .	+						+
Formol (20 p. 100) [ <i>E. perf.</i> ] . . . . .	+		+			+	+
Formol (20 p. 100) [ <i>E. st.</i> ] . . . . .	+		+			+	0
Acide phénique (5 p. 100) . . . . .	+						+
Sublimé (1 p. 1.000) . . . . .	+						+
Acide sulfurique (1 p. 100) . . . . .	+						+
Acide sulfurique (10 p. 100) . . . . .	+						+
Acide sulfurique (20 p. 100) [ <i>E. perf.</i> ] . . . . .	+		+			+	+
Acide sulfurique (20 p. 100) [ <i>E. st.</i> ] . . . . .	+		+			+	0
Lait de chaux ( <i>E. st.</i> ) . . . . .	+						+
Goudron (coaltar) [ <i>E. st.</i> ] . . . . .	+						+
Goudron (coaltar) [ <i>E. perf.</i> ] . . . . .	+						+
Eau de Javel (20 p. 100) . . . . .	+						+
Eau oxygénée pure . . . . .	+						+
Sulfate de fer (5 p. 100) . . . . .	+						+
Sulfate de cuivre (5 p. 100) . . . . .	+						+
Acide azotique (1 p. 100) . . . . .	+						+
Acide acétique (1 p. 100) . . . . .	+						+
Acide chlorhydrique (1 p. 100) . . . . .	+						+
Acide chromique (1 p. 100) . . . . .	+						+
Lessive de soude diluée à 10 p. 100 . . . . .	+						+
Chaux vive . . . . .	+						+
Cristaux de sulfate de Cu. . . . .	+						+
Cristaux de sulfate de Fe . . . . .	+						+
Cristaux de chlorure de Na . . . . .	+						+
Chlorure de chaux . . . . .	+	+				+	0
Ammoniaque (1 p. 100) . . . . .	+		+		+	+	0
Ammoniaque (5 p. 100) . . . . .	+					0	
Ammoniaque (10 p. 100) . . . . .	+			+	0	0	
Crésyl (2 p. 100) [ <i>E. perf.</i> ] . . . . .	+	+			+	0	
Crésyl (2 p. 100) [ <i>E. st.</i> ] . . . . .	+	+	+	0	+	0	
Crésyl (5 p. 100) [ <i>E. perf.</i> ] . . . . .	+	+	+	0	+	0	
Crésyl (5 p. 100) [ <i>E. st.</i> ] . . . . .	+	+	+	0			
Lysol (2 p. 100) [ <i>E. perf.</i> ] . . . . .	+					+	0
Lysol (2 p. 100) [ <i>E. st.</i> ] . . . . .	+					0	
Lysol (5 p. 100) [ <i>E. perf.</i> ] . . . . .	+	+			+	0	
Lysol (5 p. 100) [ <i>E. st.</i> ] . . . . .	+	+			+	0	

(1) Le signe + indique qu'il y a encore des oocystes vivants. Le signe +\* indique que les oocystes se sont segmentés dans la solution. Le chiffre 0 signifie qu'il n'y a plus d'oocystes vivants.

(2) Environ 9/10 de destruction.

(3) Environ 25 p. 100 de destruction.

(4) Environ 9/10 de destruction.

(5) Les parois sont déformées; les oocystes sont tués par la suite.

(6) 90 p. 100 de destruction.

(7) 25 p. 100 de destruction.

(8) 25 p. 100 de destruction.

(9) 90 p. 100 de destruction.

(10) 25 p. 100 de destruction.

(11) 25 p. 100 de destruction.

10 p. 1.000, d'acide acétique à 10 p. 1.000, d'acide chlorhydrique à 10 p. 1.000, d'acide chromique à 10 p. 1.000, de lessive de soude à 10 p. 1.000; dans le lait de chaux, le goudron, l'eau oxygénée pure; mélangés à des cristaux de sulfate de fer et de sulfate de cuivre. Un séjour dans le formol à 20 p. 100 ou l'acide sulfurique à 20 p. 100 n'altèrent la vitalité des oocystes du lapin qu'au bout de trois jours.

Les substances actives, après un temps de contact prolongé, sont dans l'ordre de valeur : le crésyl, le lysol, l'ammoniaque.

Dans le crésyl (1) à 2 p. 100, on trouve encore environ 50 p. 100 d'oocystes vivants après deux heures d'action. Il faut trente-six heures pour que tous les oocystes soient détruits. Dans les solutions à 5 p. 100, le nombre d'oocystes détruits en deux heures est plus élevé (environ 90 p. 100); mais les oocystes qui ne sont pas atteints sont très résistants, et ce n'est aussi qu'après trente-six heures de séjour dans la solution crésylée qu'ils sont incapables de se segmenter. Les oocystes d'*E. stiedæ* et ceux d'*E. perforans* var. *magna* sont plus fragiles; ils sont tués en douze heures dans le crésyl à 5 p. 100.

Les résultats sont un peu moins bons pour le lysol.

Le chlorure de chaux du commerce a donné des résultats, mais, comme pour tous les autres produits en poudre ou en cristaux (sulfate de fer, de cuivre, chaux vive), l'expérience a été faite en mélangeant intimement les excréments avec une quantité à peu près égale de désinfectant. C'est une condition non réalisable dans la pratique (2).

Il est à remarquer que les produits recommandés par différents auteurs : solution d'acide sulfurique pour désinfecter les locaux, sulfate de fer pour désinfecter les fumiers et les prairies, lait de chaux employé pour blanchir les étables, goudron pour enduire les soubassements, sont sans valeur : les oocystes se développent dans ces solutions ou sous ces enduits.

Pourquoi des désinfectants énergiques comme ceux expérimentés sont-ils impuissants contre les oocystes de coccidies? Le fait que des produits aussi différents que le formol, le sublimé,

(1) Marque Jeyes.

(2) Si l'on se borne à saupoudrer de chlorure de chaux la surface des excréments, les oocystes qui ne sont pas en contact avec le produit continuent leur évolution.

le permanganate de potasse, l'acide phénique, l'eau oxygénée, l'eau de Javel, les acides, la soude, etc. produisent exactement le même effet, indique qu'ils agissent par une propriété commune qui est sans doute ici leur pouvoir « antiseptique », c'est-à-dire leur faculté de détruire les germes bactériens.

L'exactitude de cette hypothèse est démontrée par les expériences indiquées plus haut sur le développement des oocystes en milieux peu aérés ou en milieux de culture nutritifs, ou au cours de la putréfaction. Ces antiseptiques n'agissent pas sur l'oocyste, mais sur le milieu qu'ils stérilisent. Ils détruisent les bactéries dont la multiplication gêne ou retarde la sporulation et finirait par étouffer ou intoxiquer les oocystes.

Une expérience simple le prouve. Si à une « culture » d'oocystes *en milieu infecté* — putréfaction légère, par exemple — et encore au stade non segmenté, on ajoute quelques centimètres cubes de formol ou d'acide chromique, on voit, dans les jours qui suivent, les oocystes se segmenter rapidement, tandis que, dans une « culture » témoin sans antiseptique, les oocystes n'évoluent que très tardivement ou meurent.

Il est donc certain que les antiseptiques favorisent le développement des coccidies.

Le crésyl et le lysol font exception. L'action de ces substances est lente; mais, après avoir détruit les bactéries du milieu, elles finissent par tuer les oocystes. Il est probable qu'à la longue les produits toxiques de leur solution pénètrent par osmose dans l'oocyste au niveau du micropyle, de la même façon que les poisons bactériens dans la putréfaction ou les cultures en milieux nutritifs. Les oocystes morts ont en effet exactement le même aspect: ils sont un peu gonflés, élargis et leur boule protoplasmique centrale est libre à l'intérieur du kyste.

Les acides forts agissent vraisemblablement de la même façon que les antiseptiques, c'est-à-dire en empêchant le développement des germes. Il est possible que, dans les deux cas, ces substances coagulent la surface des enveloppes de l'oocyste produisant ainsi une couche de protection pour l'oocyste, ce qui expliquerait leur non-pénétration et par suite leur non-toxicité; mais il est probable aussi que l'oocyste vivant intervient activement dans cette protection, car dès qu'il est mort il se laisse

pénétrer par ces produits, par l'acide chromique, par exemple, qui teinte en brun le contenu de l'oocyste.

Il n'y a aucune différence dans la durée de la segmentation, pour les divers acides expérimentés en solution à 1 p. 100. Les acides sulfurique, azotique, chlorhydrique, acétique, agissent comme l'acide chromique. L'acide chromique, qui est le plus communément employé comme milieu de maturation, a l'avantage de ne pas être dangereux à manipuler et de colorer les oocystes morts, ce qui donne des indications sur la vitalité des cultures avant de les expérimenter sur les lapins.

Les solutions alcalines sont-elles, comme les solutions des acides forts, favorables à la segmentation?

Nous avons dit plus haut qu'une certaine proportion d'oocystes évoluent dans une solution de soude à 10 p. 100.

Par contre, si la solution alcaline est très étendue de façon à réaliser un milieu ayant « l'alcalinité bactériologique », et si la température est élevée (25 à 38°), la segmentation ne se produit pas parce que le milieu favorise la multiplication des bactéries apportées avec les excréments coccidiés.

L'action de l'ammoniaque est différente de celle de la soude. En solution à 10 p. 100, non seulement les oocystes ne se développent pas, mais au bout de vingt-quatre heures ils sont tués comme le prouve leur incapacité de se segmenter si on les transporte dans l'acide chromique. Ce résultat est intéressant à considérer, car il contribue à expliquer le mode d'action des fumiers, dans lesquels se produit la fermentation ammoniacale, sur les oocystes. Les oocystes ne paraissant pas altérés et, leur paroi étant en bon état, il est probable que l'ammoniaque agit comme le crésyl et les autres produits toxiques par pénétration osmotique à travers la mince membrane qui, au niveau du micropyle, sépare le contenu de l'oocyste du milieu dans lequel celui-ci est plongé.

En résumé, on peut dire que les antiseptiques n'ont aucune valeur comme désinfectants dans les coccidiooses; ils ont même l'inconvénient grave de favoriser le développement et la conservation des parasites, en stérilisant le milieu par destruction des germes bactériens qu'il contient. Seuls le crésyl et le lysol font preuve d'une certaine efficacité; mais leur action est trop lente pour que leur emploi soit pratique et recommandable.

## B. — AGENTS PHYSIQUES.

Les agents expérimentés ont été la dessiccation, la chaleur sèche et humide, et le froid.

ACTION DE LA DESSICCATION. — L'action de la dessiccation seule n'est appréciable que jusqu'à 38°, c'est-à-dire dans la zone de température où les oocystes continuent à évoluer quand cette condition n'intervient pas. Cette question a été traitée plus haut (p. 36) à propos de l'influence de l'humidité sur la segmentation des oocystes, et nous avons vu combien les oocystes sont sensibles à la dessiccation, même aux températures ordinaires.

Au delà de 38°, l'action de la dessiccation se confond avec celle de la chaleur en atmosphère sèche. En effet, à partir de 40°, les oocystes sont tués par la chaleur. On ne peut se rendre compte de la part qui revient à chacune d'elles que par comparaison avec l'action de la chaleur humide aux mêmes températures.

ACTION DE LA CHALEUR SÈCHE. — Pour apprécier l'action de la chaleur en atmosphère sèche, les excréments parasités sont placés dans des étuves de températures variées. La dessiccation est évidemment d'autant plus rapide que la température est plus élevée et que les excréments sont moins humides, comme c'est le cas pour les animaux atteints de polyurie, dont les excréments sont formés de crottes sèches.

Les chiffres ci-dessous se rapportent à des excréments diarrhéiques étalés en couche mince (1 millimètre environ) sur une feuille de papier-filtre.

A 40°, les excréments sont complètement desséchés au bout de deux heures et les oocystes sont éclatés.

A 45°, tous les oocystes sont tués au bout d'une heure et au bout de quinze minutes à 55°.

Quand la dessiccation est complète, on ne trouve plus que des fragments d'enveloppes difficiles à reconnaître. La mort se produit par éclatement des parois des oocystes et on observe tous les degrés de cette altération. L'enveloppe se vide, se rétracte et se rompt, expulsant souvent le contenu de l'oocyste qui sort soit par l'ouverture micropylaire, soit par une fissure

de la paroi. Quand le protoplasme n'est pas expulsé, il se répand dans tout l'oocyste et devient vacuolaire; une mince membrane, détachée de la face interne de la paroi, s'applique plus ou moins étroitement sur lui. On voit parfois, dans le protoplasme, des sillons divisant cette masse en 3 ou 4 parties égales. Ces sillons sont vraisemblablement le résultat de la dessiccation plutôt que l'ébauche d'une segmentation invisible dans les conditions normales.

**ACTION DE LA CHALEUR HUMIDE.** — Les expériences ont été faites avec les mêmes excréments que ci-dessus. Ceux-ci étaient mis dans des récipients contenant de l'eau et placés à l'étuve, jusqu'à 55°. Au-dessus de cette température, les excréments, étalés sur papier-filtre, étaient plongés des temps variables dans de l'eau maintenue à 80° et à 100°.

Les résultats sont comparables à ceux obtenus avec la chaleur sèche, et montrent, en général, que les oocystes sont extrêmement sensibles à la chaleur. C'est ainsi que, dans l'eau bouillante, ils sont détruits en moins de cinq secondes et en dix secondes dans l'eau à 80°. On peut donc dire que les oocystes touchés sont détruits instantanément (1). A 55°, 80 p. 100 des oocystes sont détruits en vingt minutes; ils sont tous tués en une demi-heure.

La chaleur humide n'agit pas de la même façon que la chaleur sèche sur les oocystes. Ceux-ci n'éclatent pas et, très souvent, ils ne sont pas modifiés dans leur aspect. Il faut obligatoirement les soumettre à des cultures d'épreuve pour constater qu'ils sont morts et qu'ils se laissent pénétrer par l'acide chromique qui colore leur protoplasma en brun.

Quand l'action de la chaleur humide est prolongée ou que la température atteint 80°, on observe des altérations des oocystes : les parois s'épaississent et se gonflent par places; les oocystes semblent recouverts de quelques écailles ou prennent un aspect boursoufflé caractéristique; le kyste s'élargit; la boule protoplasmique n'adhère plus par son équateur aux

(1) Cette efficacité de l'eau bouillante n'avait pas échappé aux anciens auteurs et, dans son *Traité des maladies parasitaires* (2<sup>e</sup> édition), 1892, NEUMANN signale ce procédé. Depuis cette époque, la vogue des antiseptiques utilisés dans les maladies causées par les bactéries avait fait oublier cette méthode économique et vraiment efficace.

parois, ou bien éclate, et le protoplasme se répand dans tout l'ocyste.

**ACTION DU FROID.** — Nous avons vu qu'à 0° C. les oocystes conservent leur vitalité un temps indéfini sans se segmenter. Que deviennent-ils quand la température est plus basse? J'ai étudié sur *E. perforans* et *E. stiedæ*, dans des crottes écrasées ou entières, l'action des températures de — 5°, — 10°, — 15° C. obtenues au moyen de mélanges réfrigérants. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-après (n° VI). Les crottes écrasées étaient placées dans de petits tubes de verre, ce qui peut expliquer la moindre proportion d'oocystes détruits qu'à la surface des crottes entières mises directement au contact du mélange réfrigérant. On voit que, dans ce dernier cas, à — 10° C., la proportion d'oocystes détruits est de 90 p. 100 pour *E. perforans* et de 100 p. 100 pour *E. stiedæ* et les grandes formes d'*E. perforans* qui se montrent toujours plus fragiles. Il n'est donc pas douteux que le froid, comme la chaleur, est un agent de destruction des oocystes.

TABLEAU VI. — **Action du froid sur les oocystes.**  
(Pourcentage de destruction)

TEMPÉRATURE en degrés	CROTTE ÉCRASÉE		CROTTE ENTIÈRE (SURFACE)		CROTTE ENTIÈRE (CENTRE)	
	<i>E. perforans</i>	<i>E. stiedæ</i>	<i>E. perforans</i>	<i>E. stiedæ</i>	<i>E. perforans</i>	<i>E. stiedæ</i>
0	0	0	0	0	0	0
— 5			50	75		
— 10	50	75	90	100	50	50
— 15	80	80	100	100	50	50

Il est intéressant de remarquer que les oocystes détruits sont éclatés comme après l'action de la dessiccation et celle de la chaleur sèche, mais ici le processus de destruction est différent : au lieu de se rétracter, l'ocyste éclate par suite de la congélation de son protoplasme.

### Destruction des oocystes sporulés.

Malgré la difficulté de conserver du matériel frais, la plus grande partie de mes recherches expérimentales a été faite, pour des facilités de contrôle, avec des oocystes non segmentés. Il était possible ainsi de s'assurer, par la mise en culture, que les oocystes traités étaient tués ou étaient restés vivants. Mais il ne faut pas perdre de vue que, dans les conditions naturelles, en raison de la rapidité relative de la sporulation, les oocystes ne restent pas longtemps à l'état non segmenté. La vraie forme d'attente est l'oocyste mûr qui ne subit plus de modifications jusqu'à ce qu'il soit ingéré par un hôte sensible.

Il était important de savoir si la résistance des oocystes segmentés, dans lesquels les sporozoïtes sont doublement protégés par l'enveloppe générale du kyste et par celle des sporocystes, est différente de celle des oocystes fraîchement émis.

Il n'y a plus à tenir compte ici des conditions biologiques qui arrêtent ou entravent la segmentation, celle-ci étant un fait accompli. Nous n'avons donc qu'à examiner l'action des substances chimiques et celle des agents physiques.

Pour les *substances chimiques*, il est évident que celles dans lesquelles la sporulation s'accomplit sont sans action nocive sur les sporozoïtes. On peut constater d'ailleurs que les oocystes segmentés dans les solutions des produits indiqués dans le tableau V sont restés capables d'infecter de jeunes lapins après plusieurs semaines de séjour dans ces solutions. Pour celles dans lesquelles la segmentation ne se produit pas (crésyl, lysol, ammoniacque) et qui possèdent une certaine toxicité pour les oocystes frais, l'expérience montre que ces substances chimiques sont encore moins actives sur les oocystes segmentés. Après vingt-quatre heures de séjour dans des solutions de crésyl ou de lysol à 5 p. 100 et d'ammoniacque à 10 p. 100, plus de la moitié des oocystes segmentés (reportés ensuite dans l'acide chromique) ne se laissent pas pénétrer par ce colorant et sont donc restés vivants. Ils ne sont même pas tous tués après trente-six heures de séjour dans la solution antiseptique.

Pour les *agents physiques* dont l'action a été étudiée sur les

oocystes non segmentés, il n'est pas douteux qu'ils peuvent également détruire les oocystes sporulés.

Nous avons vu que, comme condition de la conservation des oocystes segmentés, il fallait de l'humidité. Si l'on néglige, en été, de mettre en chambre humide des boîtes de Petri renfermant des oocystes sporulés, les excréments qu'elles contiennent se dessèchent complètement ainsi que les oocystes dont on ne trouve plus, au bout de quelques jours, que des fragments d'enveloppe.

L'expérience montre que la résistance des oocystes segmentés est plus grande que celle des oocystes non segmentés. A 55° à sec, au bout d'un quart d'heure, tous les oocystes sont éclatés. Parmi les sporocystes libérés, un petit nombre ne paraissent pas abîmés et ne se laissent pas pénétrer par l'acide chromique. La limite de résistance à la dessiccation, à cette température, est donc un peu plus éloignée. Au bout d'une heure à 45°, les excréments sont complètement desséchés et on ne trouve plus d'oocystes intacts; des sporocystes sont libres, mais leur paroi commence à se rétracter. A 25°, au bout de deux heures, la couche mince d'excréments est desséchée; on ne retrouve plus d'oocystes. Les quelques sporocystes libres reconnaissables ont leurs enveloppes plissées.

Par contre, des oocystes semblables, maintenus à sec entre 100 et 110° pendant cinq minutes, ne paraissent pas altérés. Les excréments ne sont pas encore complètement desséchés et la plupart des oocystes sont intacts. Il semble donc que la dessiccation prolongée, même à basse température, est plus efficace pour détruire les oocystes que l'action de courte durée d'une température élevée.

Il en est de même pour la chaleur humide. Les oocystes sont plus complètement détruits par un séjour de six heures dans l'eau à 45° et de deux heures dans l'eau à 55° que par une exposition de trente secondes dans l'eau bouillante qui tue certainement les oocystes non segmentés. A cette température de 100°, seule l'enveloppe du kyste semble touchée profondément et, bien que l'enveloppe des sporocystes paraisse être devenue un peu plus épaisse et plus réfringente, le simple examen ne permet pas de dire si les sporozoïtes sont morts.

Pour juger de la vitalité de ces oocystes sporulés d'*E. perfo-*

*rans*, après action de la chaleur sèche ou humide dans les conditions indiquées ci-dessus, on les donne en ingestion, à forte dose, à des lapins neufs. On constate que ceux traités par l'eau bouillante pendant trente secondes, par la chaleur sèche à 110° pendant cinq minutes, et à 45° pendant une heure, donnent aux lapins des infections coccidiennes légères. Tous les oocystes n'avaient donc pas été détruits. Par contre, le lapin qui avait ingéré des oocystes sporulés soumis à la dessiccation, en couche mince, à 35° pendant une heure, ne s'est pas infecté.

L'action du froid sur les oocystes segmentés est moins nette que sur les oocystes frais. Dans des excréments placés dans un mélange réfrigérant à — 10° C., un petit nombre seulement d'oocystes éclatent, et le lapin, qui ingère les oocystes ainsi traités, s'infecte de coccidiose.

En somme, d'une façon générale, les oocystes segmentés sont plus résistants que les oocystes frais. En ce qui concerne les agents physiques — dessiccation, chaleur, froid — ils sont surtout plus résistants aux actions brusques et de courte durée de ces agents. Dans ces cas, l'enveloppe du kyste est le plus souvent seule atteinte et un certain nombre de sporozoïtes restent vivants. Mais quand l'action de la dessiccation et de la chaleur est prolongée, même si elle est moins intense, les sporozoïtes sont touchés à leur tour et sont détruits.

\*  
\* \*

En résumé, les oocystes des coccidies se comportent d'une façon très différente à l'égard des produits chimiques et des agents physiques.

Dans le premier cas, ils font preuve d'une résistance rare et remarquable, continuant leur évolution dans les solutions antiseptiques les plus énergiques. Dans le deuxième, au contraire, ils montrent, vis-à-vis de la dessiccation et de la chaleur, une délicatesse, une fragilité extrêmes qui permettent de les tuer aisément, et qui sont sans aucun doute les causes ordinaires de leur destruction dans la nature.

Cette efficacité des agents physiques est intéressante à considérer en raison des applications qu'elle peut recevoir dans la prophylaxie des coccidioses.

## IV. — PROPHYLAXIE DES COCCIDIOSES

Les expériences qui précèdent ont été faites pour la plupart avec les oocystes du lapin. La biologie de ceux-ci n'étant pas différente de celle des autres espèces d'oocystes à parois épaisses, tout permet de penser que les résultats obtenus s'appliquent aussi aux oocystes des autres mammifères et des oiseaux.

Cela nous permet d'envisager d'une façon générale la prophylaxie des coccidioses des animaux domestiques à la lumière des connaissances précisées au cours du présent travail.

\*  
\* \*

On sait que l'infection coccidienne est transmise uniquement par les oocystes mûrs et qu'elle se prend exclusivement par ingestion.

Le but des méthodes de prophylaxie devra donc être d'empêcher la contamination des aliments en éloignant, des animaux sensibles, les oocystes mûrs (ou inversement) et de détruire les oocystes.

A. — MÉTHODES DESTINÉES A EMPÊCHER L'INGESTION  
DES OOCYSTES MÛRS.

J'ai exposé dans un précédent chapitre les précautions qu'il convient de prendre pour obtenir des élevages de lapins indemnes de coccidiose. On y réussit généralement pendant un temps très court; mais à moins d'opérer en milieu non contaminé, ce qui est tout à fait exceptionnel, on ne tarde pas à voir apparaître des oocystes dans les excréments des animaux que l'on croyait neufs (1).

(1) On est en droit de se demander si les mouches ne jouent pas un rôle dans le transport des oocystes. Je n'ai fait à ce sujet qu'une expérience avec la mouche domestique à qui j'ai fait ingérer des oocystes mélangés à de l'eau sucrée. J'ai retrouvé des oocystes intacts dans l'intestin, mais je n'en ai pas vu dans les excréments des mouches. Cela ne veut pas dire qu'ils ont été détruits. Il y aurait lieu de faire de nouvelles recherches dans cette voie en s'adressant de préférence à l'espèce de mouche *Mydxa platyptera* qui abonde au printemps et en été dans les clapiers. Bien que les larves de mouches

Les contaminations sont favorisées par la densité des animaux dans les cages d'élevage. Plus les portées sont nombreuses et la surface réduite, plus la coccidiose est fréquente et grave, car les animaux peuvent se surinfecter plus aisément.

L'idéal serait l'isolement individuel dès le sevrage dans des cages à fond grillagé de tous les jeunes animaux. Cette mesure, applicable au laboratoire, n'est pas recommandable dans la pratique, car elle place les jeunes dans des conditions hygiéniques et alimentaires peu favorables à leur croissance rapide (froid, suppression brusque de l'allaitement maternel, etc.).

La prophylaxie individuelle n'étant pas possible, il nous faut envisager la protection des lapins, de la même façon que celle des autres animaux domestiques vivant en troupeaux, comme une question de prophylaxie collective.

Nous nous supposons en milieu contaminé, la prophylaxie en milieu sain se réduisant à éviter l'importation, dans le troupeau ou l'élevage, d'animaux infectés que l'on ne peut reconnaître en dehors des accès de maladie aiguë avec symptômes caractéristiques que par l'examen microscopique des excréments.

L'éloignement des animaux sensibles des oocystes mûrs peut être réalisé de différentes façons :

a) Une première méthode consiste à mettre à profit la période de non-infectiosité des oocystes. Connaissant la durée minima de la segmentation des oocystes qui est de trente à trente-six heures entre 25° et 38° et supérieure à quarante-huit heures entre 2° et 18° dans les conditions les plus favorables, il

soient très nombreuses dans le fumier des cages, il est peu probable qu'elles puissent transmettre à l'insecte les oocystes qu'elles ingèrent avec le fumier, car elles vident leur intestin au cours de la nymphose. Mais il n'est pas nécessaire que les oocystes soient ingérés par les larves ni par les insectes et rien ne s'oppose à ce que les mouches des clapiers qui visitent alternativement les litières et les mangeoires des lapins (et en général toutes les mouches qui vivent dans les étables et qui se nourrissent des débris organiques trouvés dans les mangeoires et les litières) transportent d'une façon mécanique sous leurs pattes ou leur abdomen des parcelles d'excréments parasités. Il semble donc indiqué de prendre toutes mesures efficaces pour empêcher l'accès des mouches dans les cages d'élevage et les étables et de s'efforcer de les détruire au même titre que les oocystes. La méthode biologique indiquée plus loin permet d'obtenir ce double résultat.

est indiqué d'enlever les fumiers des animaux tous les jours en été et au moins tous les deux jours en hiver. Pour les petits animaux (lapins, rats, souris, oiseaux) qui vivent en cages dont la superficie n'est jamais considérable et qui peuvent conserver sous leurs pattes des parcelles d'excréments parasités susceptibles de souiller les aliments, il est préférable d'adopter des dispositifs assurant la séparation automatique des excréments aussitôt après leur émission et permettant de supprimer la litière. Ces dispositifs peuvent être réalisés de différentes façons : double fond grillagé à mailles permettant le passage des crottes, plancher recouvert de claies ou formé de lames de bois assez écartées pour laisser passer les excréments, comme en emploient Remlinger et Bel (1924). Pour la facilité de la désinfection, les doubles fonds métalliques amovibles sont préférables (1). Ils devront pouvoir se placer sur un plancher très incliné (servant de toit, par exemple, à la cage sous-jacente) de façon à assurer l'écoulement des urines et des excréments du côté opposé à celui où se fait l'administration des aliments. Ceux-ci devraient être donnés dans des râteliers extérieurs à la cage et où la tête seule des animaux aurait accès au moyen d'ouvertures de largeur variable.

Pour les grands animaux attachés individuellement à une mangeoire, les chances de contamination et de surinfection sont d'autant plus réduites qu'il est plus difficile aux excréments de souiller les aliments et aux animaux de manger la partie des litières souillées par leurs déjections ou celles de leurs voisins. Un dispositif très recommandable à ce sujet et fréquemment employé pour les bovidés est celui qui consiste à placer les auges et râteliers dans un couloir de distribution séparé de l'étable proprement dite et communiquant avec celle-ci par des ouvertures rectangulaires de largeur suffisante pour permettre à chaque animal de passer sa tête et son encolure.

On pourrait imaginer un dispositif analogue pour les moutons dans les troupeaux où sévit la coccidiose, car il est pro-

(1) Les mères ne font pas volontiers leur nid sur de tels planchers. Dans les cages d'élevage de lapins, on disposera à l'abri du vent et de la lumière vive un plateau ou une corbeille basse en osier, garnis de paille ou de coton dans lesquels les mères feront leur nid. Pour les rats et les souris, il est indispensable également de prévoir un nid semblable garni de coton.

bable que la contamination se fait d'abord à l'étable avant la mise au pâturage (Spiegl) et se continue dans les prairies humides où les oocystes sont placés dans de bonnes conditions d'évolution et de conservation.

b) Un autre procédé consiste à faire l'opération inverse, c'est-à-dire à laisser les excréments parasités à l'endroit où ils sont tombés et à en éloigner les animaux sensibles avant que les oocystes soient complètement segmentés et jusqu'à ce qu'ils soient détruits. On peut obtenir ce résultat en déplaçant fréquemment les troupeaux. Pour les moutons, chez lesquels la durée de sporulation des oocystes est de trente-cinq heures, on leur donnera à paître chaque jour une nouvelle parcelle de pâturage. Les animaux ne peuvent ainsi ingérer que les oocystes émis depuis moins de vingt-quatre heures, c'est-à-dire non infectieux. C'est une méthode analogue à celle dite de « la rotation des pâturages », employée dans la prophylaxie des piroplasmoses. Ici les données sont plus simples, mais moins précises, car on ne connaît pas, comme pour chaque espèce de tiques, la durée maxima de la résistance du parasite. Le temps de vitalité des oocystes dans les pâturages varie avec la température et surtout l'état d'humidité dans lequel ils se trouvent. Il n'est pas douteux qu'au printemps, dans l'herbe verte et humide, les oocystes peuvent se conserver un certain temps en bon état, mais, sachant que la chaleur et la dessiccation les détruisent aisément, on peut admettre qu'ils ne résistent pas à la sécheresse de l'été.

c) Un troisième procédé, dont l'efficacité peut être expliquée par la mise à profit à la fois de la phase négative des oocystes non segmentés et de la destruction des oocystes par dessiccation à la température ordinaire, est celui déjà utilisé par Rivolta et Delprato (1881) dans la coccidiose des canaris produite par *Isospora lucizei*. Il a été employé avec succès par Spiegl dans la coccidiose de l'agneau. Il faut disposer de deux étables que l'on fait alterner toutes les vingt-quatre heures pendant une quinzaine de jours (1). Chaque jour, l'étable non occupée est nettoyée à sec par grattage et balayage. Une épizootie de coccidiose a pu être enrayée de la sorte en quatorze jours.

(1) On pourrait aussi partager en deux parties, au moyen d'une séparation provisoire, une étable assez grande.

## B. — DÉSINFECTION.

La destruction de l'agent d'infection comprend la suppression de la source des oocystes et la désinfection proprement dite.

a) LA SUPPRESSION DE LA SOURCE DU VIRUS, par l'abatage des malades, a été préconisée pour les coccidies du lapin par un auteur allemand, Sustmann (1917). Cette mesure ne serait efficace que si elle était étendue aux adultes porteurs de germes, c'est-à-dire, le plus souvent, à tout l'effectif de tous les clapiers. Dans l'état actuel de l'extension de la maladie, il faudrait sacrifier toute l'espèce *Lepus domesticus* et l'on n'aurait pas la satisfaction d'avoir détruit les espèces de coccidies du lapin, car il resterait encore les lapins de garenne qui hébergent vraisemblablement les mêmes parasites. Cette méthode, trop radicale, n'est donc pas applicable sous cette forme. Elle n'est à envisager que dans certaines circonstances, par exemple au moment de l'introduction de la maladie dans un troupeau jusque-là indemne, si l'infection est reconnue avant qu'un grand nombre d'animaux soient contaminés. Au début, les animaux sont encore en bon état et peuvent être utilisés pour la boucherie.

Le plus souvent, il y aura lieu de se borner à isoler les malades.

b) LA DÉSINFECTION a pour but la destruction des formes de résistance et d'infection du parasite, c'est-à-dire des oocystes mûrs ou non (car ces derniers ne tarderont pas à être eux-mêmes sporulés).

Ces oocystes sont disséminés dans le milieu extérieur avec les excréments des malades. Leur destruction consiste donc à « désinfecter » ces excréments partout où ils se trouvent (litières, fumiers, pâturages, cours, passages, etc.), ainsi que les locaux, cages, objets, souillés par eux.

Il y a lieu d'envisager aussi la destruction des oocystes contenus dans l'intestin des animaux morts ou sacrifiés.

Dans le choix des méthodes de désinfection, il y a lieu d'éliminer entièrement l'emploi des substances chimiques qui sont, ainsi qu'on l'a vu, sans aucune valeur pour la destruction des oocystes.

*La désinfection des litières* pourrait être réalisée par la chaleur en arrosant les fumiers frais d'eau bouillante; la température de celle-ci baisse au contact des litières, mais nous avons vu que, même à 80°, les oocystes non sporulés sont détruits presque instantanément. C'est une opération peu pratique. Le procédé qui me paraît le plus recommandable est la *méthode bio-thermique* imaginée par Roubaud (1915) pour détruire les œufs de la mouche domestique dans les tas de fumier. Cet auteur a montré que la température des fumiers peut atteindre de 70° C. à 90° C. dans le centre du tas. Voici en quoi consiste cette méthode : « On peut utiliser la chaleur de fermentation d'un tas de fumier pour la destruction des larves qu'il contient. La larve de la mouche domestique, soumise dans le fumier à 50° C. de température, à l'abri des gaz de fermentation, meurt en trois minutes. Au contact direct des gaz, elle est tuée en une minute à 51° C.; elle meurt en cinq à sept secondes à 59° C.; à 60° C. en quatre à cinq secondes. Lorsque l'on remanie un tas de fumier, les larves qui tombent au contact des parties chaudes de l'intérieur sont tuées instantanément. Un brassage total, pratiqué dès le lendemain du dépôt et renouvelé les deux jours qui suivent, fait disparaître 90 p. 100 des larves.

L'opération est rendue beaucoup plus efficace et plus facile si, au lieu d'attendre que le tas de fumier infesté ait produit lui-même la température nécessaire, on le traite directement au sortir de l'écurie par la chaleur de fermentation d'un tas préexistant (tas de la veille ou de la semaine). Pour cela, au lieu de déposer simplement l'apport nouveau à la surface du tas comme il est fait d'ordinaire, on l'enfouira au contact des parties chaudes en le recouvrant complètement sur toutes les surfaces d'une couche de 20 centimètres de fumier *chaud*. La chaleur sous-jacente se communique rapidement à la masse fraîche, dont elle stérilise les œufs, qu'elle renferme en quantités énormes, avant qu'ils aient pu se développer.

En quatre ou cinq heures, l'apport nouveau peut être considéré comme entièrement débarrassé des œufs et larves qui auraient dû s'y développer par milliers.

Cette méthode biologique de délarvisation par la chaleur équivaut, en somme, à un *chauffage accéléré et total* à 50-60° C., du fumier frais, effectué sans aucune dépense d'appareil ni de

*combustible. Elle est à la portée de tous et ne nécessite qu'une éducation très simple du personnel. Dans la pratique, la masse de fermentation qui fournira la température nécessaire doit être environ huit fois celle du fumier à traiter. Dès le lendemain, celui-ci peut être utilisé à son tour comme source thermique.*

Roubaud recommande le fumier de cheval qui dégage plus de chaleur et qui existe généralement en assez grande quantité pour former des tas volumineux dans lesquels la fermentation est plus active et plus prolongée. Les oocystes étant très sensibles à la chaleur, puisqu'ils sont tués à partir de 40°, il n'est pas douteux que cette méthode est efficace, et qu'en même temps que les œufs et larves de mouches elle peut détruire les oocystes. Elle est d'autant plus efficace que, dans le cas particulier, à l'action de la chaleur vient s'ajouter l'action de l'ammoniaque et celle des autres produits de la fermentation qui, ainsi qu'on l'a vu, sont toxiques pour les oocystes.

Dans une note ultérieure, Roubaud (1915, n° 2) a montré que cette méthode peut être encore simplifiée s'il s'agit de fumier n'ayant pas plus de vingt-quatre heures de séjour à l'écurie, c'est-à-dire de fumier renouvelé tous les jours (comme on doit le faire, ainsi que je l'ai dit plus haut dans les étables où sévit la coccidiose). Au lieu d'enfouir l'apport nouveau à l'intérieur du tas en fermentation, il suffit de le déposer à la surface, dans une légère dépression pratiquée vers le milieu du tas où la chaleur est la plus élevée. Par ce procédé très simple, la chaleur de fermentation s'étend rapidement à la masse fraîche. Pour la destruction des oocystes seuls, qui sont plus sensibles à la chaleur que les larves et œufs de mouche, il est probable que le simple entassement régulier du fumier suffit, à condition de recouvrir chaque jour le fumier de la veille et de le laisser fermenter un temps suffisant.

Pour la *désinfection des pâturages*, certains auteurs recommandent le sulfatage. Nous avons vu que les oocystes se segmentent dans des solutions de sulfate de fer et de sulfate de cuivre, et que même les cristaux de ces sels n'empêchent pas la sporulation. C'est donc un procédé à abandonner. Dans les conditions naturelles, la destruction des oocystes est certainement effectuée par l'action de la sécheresse et de la chaleur. Il est donc indiqué de favoriser l'action de ces agents naturels en

fauchant en été, au moment des foin, l'herbe des pâturages infestés que l'on aura laissée pousser après le passage des animaux coccidiés. Les oocystes pourront être ainsi plus facilement touchés par la dessiccation et, après quelques jours de sécheresse et de chaleur estivale, il est probable qu'ils seront détruits. Le foin, récolté dans les pâturages infestés et rentré *bien sec*, peut être consommé sans inconvénient par tous les animaux.

Pour la *désinfection des locaux, cages et objets souillés* par les excréments parasités, on donnera la préférence à l'eau bouillante ou à la chaleur sèche. Quand la disposition des locaux s'y prête, ce dernier procédé, d'une efficacité certaine, est d'un emploi facile. Après avoir enlevé les litières et les excréments, gratté les parties souillées et balayé le sol, il suffit de maintenir dans le local, par exemple au moyen de poêles ou de braseros, une température supérieure à 25° C. pendant au moins vingt-quatre heures pour que les oocystes soient détruits par dessiccation. Si les locaux ne sont pas suffisamment clos pour que ce procédé puisse être employé, une large ventilation et l'exposition au soleil faciliteront la dessiccation. La désinfection des objets métalliques (planchers amovibles des cages, etc.) pourra être effectuée plus rapidement par le flambage ou le séjour, pendant une nuit par exemple, dans un four ou une chambre chaude.

En été, tout le matériel déplaçable (cages, planchers, auges, râteliers, etc.) sera avantageusement exposé au soleil après nettoyage à sec.

Pour la construction des clapiers en plein air, on donnera la préférence à l'exposition au midi.

*La désinfection des cours et passages* fréquentés par les troupeaux infectés consiste dans le nettoyage à sec : balayage et enlèvement des excréments. Souvent, pour les troupeaux de moutons notamment, qui empruntent chaque jour le même chemin pour rejoindre leur étable, cette précaution est négligée; les animaux et le personnel transportent sous leurs pieds ou leurs chaussures des parcelles d'excréments infectés. Il y a là une cause de diffusion de la maladie qui n'est pas négligeable.

*La désinfection des cadavres et des intestins des animaux*

*sacrifiés* s'opère automatiquement si rien ne vient la contrarier. Nous avons vu que la putréfaction arrête la segmentation et détruit finalement les oocystes si ceux-ci restent dans le tube digestif. Il y a donc lieu de veiller à ce que les cadavres et intestins ne soient pas traînés et ouverts par les chiens. La destruction des oocystes sera accélérée par l'enfouissement des cadavres et intestins dans les tas de fumier en fermentation.

### CONCLUSIONS

1° Les oocystes peuvent être conservés à l'état non segmenté à la glacière ou au frigorifique entre 0 et 2° C.

2° Les cultures microbiennes et notamment la putréfaction empêchent la segmentation et finissent par tuer les oocystes.

3° Les oocystes segmentés, maintenus en milieu humide non infecté entre 0 et 38° C., peuvent rester vivants pendant un temps indéterminé, mais certainement supérieur à un an.

4° La plupart des substances chimiques employées comme désinfectants n'ont aucune action destructrice sur les oocystes. Au contraire, elles favorisent leur évolution et leur conservation en stérilisant le milieu par destruction des germes bactériens qu'il contient.

5° La dessiccation complète détruit les oocystes quelle que soit la température.

6° Les oocystes sont tués par la chaleur au-dessus de 40° C.

7° Les oocystes sont également détruits par la congélation.

8° Les oocystes sporulés sont plus résistants que les oocystes non segmentés. Il est donc indiqué, pour la prophylaxie des coccidioses, de faire porter les efforts de destruction des oocystes sur les kystes fraîchement émis, avant que leur résistance soit renforcée par la sporulation.

9° Les résultats obtenus étant plus d'ordre biologique que spécifique, tout permet de penser qu'ils s'appliquent également aux oocystes des autres coccidies à paroi épaisse. Les données qui précèdent peuvent donc servir de base à une prophylaxie rationnelle des coccidioses des mammifères et des oiseaux.

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- BARANSKI (A.) [1879]. — Psorospermien der Haussäugethiere. *Oesterr. Vierteljahrz. für wissensch. Veterinärk.*, t. 51, p. 101-131.
- BRUCE (E. A.) [1919]. — A preliminary note on a new *Coccidium* of rabbits. *Journ. American veter. med. assoc.*, septembre.
- CARSWELL (R.) [1838]. — *Pathological anatomy. Illustrations of the Elementary Forms of Disease*. In-fol., London.
- DOBELL (CLIFFORD) [1922]. — The Discovery of the *Coccidia*. *Parasitology*, t. 14, 28 décembre 1922.
- GALLI-VALERIO (B.) [1919]. — Notes de parasitologie et technique parasitologique. *Schweiz. Archiv f. Tierheilk.*, juillet-août 1919, p. 289.
- HAKE (T. G.) [1839]. — *Carcinoma of the hepatic ducts*, in-4°, London.
- LEUCKART (R.) [1879]. — *Die Parasiten des Menschen*, 2<sup>e</sup> éd., t. 1. in 8°, Leipzig et Heidelberg.
- LUCET (A.) [1913]. — Recherches expérimentales sur la coccidiose du lapin domestique. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, t. 157, p. 1091.
- LUCET (A.) [1913]. — Transmission expérimentale du *Coccidium oviforme* du lapin domestique. *Bull. Soc. Cent. de méd. vét.*, 1913, p. 446.
- LUCET (A.) [1913]. — Recherches sur le développement du « *Coccidium oviforme* » du lapin domestique. *Bull. Soc. nat. d'Acclimatation de France*, octobre 1914.
- LUCET (A.) [1891]. — Voir Railliet.
- METZNER (R.) [1903]. — Untersuchungen an *Coccidium cuniculi*, 1. Teil. *Archiv für Protist.*, t. 2, p. 13.
- V. NEDERVEEN (H. J.) [1923]. — *Tijdschr. v. Vergelijk. Geneesk. enz.* 7, 8 et 9, f. 1, 2, 3, 4.
- NEUMANN (L. G.) [1892]. — *Traité des maladies parasitaires non microbiennes des animaux domestiques*, 2<sup>e</sup> édition, Paris.
- NÖLLER (W.), SCHURJOHANN (S.) et VORBRONT (K.) [1922]. — Zur Kenntnis der Ziegen und Schafkokzidiose. *Berl. tierärztl. Woch.*, 27 avril 1922, p. 193.
- PÉRARD (C.-H.) [1924]. — Recherches sur les coccidies et les coccidioses du lapin. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, t. 178, 16 juin 1924, p. 2131.
- PÉRARD (C.-H.) [1924]. — Recherches sur la destruction des oocystes de coccidies. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, t. 179, 15 décembre 1924, p. 1436.
- RAILLIET (A.) [1895]. — *Traité de zoologie médicale et agricole*, 2<sup>e</sup> édition, Paris.
- RAILLIET (A.) et LUCET (A.) [1891]. — Coccidies de l'épithélium intestinal (développement expérimental) chez le lapin et la poule. *C. R. Soc. Biol.*, 1891, p. 820.
- RAILLIET (A.) et LUCET (A.) [1891]. — Note sur quelques espèces de coccidies encore peu étudiées. *Bull. Soc. Zool. de France*, p. 246.

- REICHENOW (E.) [1921]. — Die Coccidien. *Handbuch der pathogenen Protozoen* (Prowazek-Nöller), fasc. 8.
- REMLINGER (P.) et BEL (P.) [1924]. — L'élevage du lapin et du cobaye dans les laboratoires. *Bull. Inst. Pasteur*, t. 22, p. 89.
- RIECK (M.) [1888]. — Sporozoen als Krankheitserreger bei Hausthieren. *Deutsche Zeitschr. f. Thiermed. u. vergl. Pathol.*, t. 14.
- RIVOLTA (S.) et DELPRATO (P.) [1881]. — *L'Ornitoiatria o la medecina degli uccelli domestici e semidomestici*. Pisa.
- ROUBAUD (E.) [1915]. — Production et auto-destruction par le fumier de cheval des mouches domestiques. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, t. 161, p. 325.
- ROUBAUD (E.) [1915]. — Etudes biologiques sur la mouche domestique. Méthode biothermique de destruction des œufs dans les tas de fumier. *C. R. Soc. de Biol.*, t. 78, 1915, p. 615.
- RUDOVSKY (F.) [1921]. — Die Kokzidiose der Wanderratte (*Mus decumanus* Pall.) und ihre Beziehung zur Kaninchenkokzidiose. *Centralbl. f. Bakter., I. Origin.*, 87, 30 décembre 1921.
- SCHAUDINN (E.) [1900]. — Untersuchungen über den Generationswechsel bei Coccidien. *Zoologische Jahrbücher. Abt. für Anatomie*, t. 13, p. 197.
- SPIEGL (A.) [1923]. — *Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere*, t. 24, p. 316.
- V. WASIELEWSKI (Th.) [1904]. — *Studien u. Mikrophotogramme zur Kenntnis d. path. Protozoen*. H. 1, Leipzig.
- V. WASIELEWSKI (Th.) [1924]. — Fortschritte der Coccidienforschung. *Weichardt's Ergebnisse der Hygiene, Bakter., etc.*, p. 305.
- WENYON (C. M.) [1923]. — Coccidiosis of cats and dogs and the status of the *Isospora* of man. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, t. 17, n° 2, p. 231-273.

## DE LA VALEUR PRATIQUE DU NEUROVACCIN

par le Dr GAILLARD.

*(Travail de l'Institut Alphonse XIII de Madrid.)*

Le neurovaccin antivariolique de Levaditi et Nicolau est parvenu à résoudre le but poursuivi depuis longtemps par les Instituts vaccino-gènes chargés de la préparation des pulpes vaccinales. Ce but comprend : la virulence, la survie des germes et la pureté du vaccin.

On peut considérer la première de ces conditions comme résolue, puisque la majorité de ces Instituts livrent des lymphes de grande virulence. La deuxième condition n'est pas toujours satisfaite. Les pulpes glycinées couramment employées perdent facilement une partie de leur activité, bien que conservées à la glacière. La troisième condition n'a jamais été réalisée, malgré l'épuration par la glycérine et les soins pris au cours des inoculations.

Dans notre Institut, grâce à l'initiative du chef du Service, M. le Dr Yllera, on a pu préparer des lymphes extrêmement virulentes, par inoculation aux veaux de virus vaccinal cultivé dans le testicule du lapin (Noguchi) (plus de quarante passages). Ces lymphes se conservent bien pendant plusieurs semaines, à une température de 18°-20°; mais à 37°<sup>5</sup>, leur virulence devient, en quarante-huit heures, pratiquement nulle.

Depuis que nous connaissons les recherches de Levaditi et Nicolau sur le neurovaccin, nous y trouvons un champ d'études fertile à de nouvelles investigations. J'exposerai dans ce travail ce que j'ai fait, ce que j'ai obtenu et les considérations qui s'en dégagent.

Levaditi et Nicolau sont partis d'un neurovaccin préparé par eux et entretenu par des passages cérébraux réguliers. Nous nous sommes servi d'un virus testiculaire, avec lequel nous avons déjà obtenu de bons résultats dans la vaccination des veaux. Nous avons effectué toutes nos expériences en vue de

l'utilisation possible du neurovaccin dans la pratique courante. Voici notre mode de procéder :

Un lapin est inoculé dans le testicule avec un virus ayant déjà subi un passage testiculaire antérieur ; on extirpe le testicule avec les précautions habituelles, et on le recueille dans une boîte de Pétri. Nous le divisons en trois portions : la plus grande, que nous introduisons dans un tube contenant de la glycérine, et deux autres portions plus petites, que nous conservons dans des tubes remplis d'une solution saline et de bouillon ordinaire. Placé à 37°, le bouillon reste stérile. Nous retirons alors de la glacière le tube de solution saline et, après l'avoir fortement agité, nous en remplissons une seringue prête pour la première inoculation intracérébrale.

La technique est des plus simples : après avoir rasé la région fronto-pariétale et préalablement immobilisé l'animal, on désinfecte la peau avec de la teinture d'iode et on fait une incision médiane en détachant légèrement le périoste. On applique un peu en dehors de la ligne médiane un trépan, sans faire tomber la rondelle osseuse. Par le petit orifice central de la couronne, on pénètre avec l'aiguille dans la masse cérébrale et, doucement, on injecte 0 c. c. 2 de l'émulsion testiculaire saline. Une rapide suture de la peau et un badigeonnage à la teinture d'iode terminent l'opération.

Notre premier lapin a présenté des parésies manifestes au troisième jour, de la paralysie, des contractures et de la difficulté respiratoire au quatrième jour, et a succombé le cinquième jour.

Tous nos lapins de passage, actuellement au nombre de quatre-vingt-neuf, sont morts du quatrième au sixième jour, sans que nous ayons eu à déplorer une seule contamination. Les précautions aseptiques ne furent jamais négligées.

Avec le passage n° 1, nous avons pratiqué des inoculations cutanées (procédé intradermique de Groth, voir plus loin), testiculaires et cérébrales, cela par lots de quatre lapins ; nous avons obtenu des pustules manifestes, une orchite vaccinale typique et la mort avec une émulsion au 50.000° (injection dans le cerveau). Chez l'homme, nous avons fait des vaccinations par scarification linéaire, avec une émulsion glycinée au cinquième ; sur quinze nourrissons de quatre mois à deux ans observés par nous, six présentèrent, à notre vive satisfaction, une petite pustule sans aréole, au centre de la scarification.

Avec le passage n° 9, de nouvelles épreuves furent faites

sur plusieurs lots de lapins, avec les résultats suivants : sur la peau, pustules avec une dilution au  $1/100.000^e$  ; dans le testicule, cette même émulsion provoqua une légère réaction seulement du cinquième au sixième jour ; avec des doses au  $80.000^e$  et au  $40.000^e$ , l'injection provoqua des orchites violentes.

Deux lapins sont inoculés dans le cerveau avec une émulsion au  $100.000^e$  ; l'un succombe le huitième jour, l'autre survit. Les testicules extirpés des lapins morts donnèrent des pustules cutanées.

Etant au début de la période pendant laquelle on pratique la plupart des vaccinations, j'ai pu, avec ce vaccin de passage, faire des constatations qui me paraissent intéressantes. Cent quarante nourrissons furent vaccinés. Quatre-vingt-quatre d'entre eux fournirent des résultats positifs, soit 60 p. 100. Les pustules se développèrent régulièrement ; elles étaient purulentes et entourées d'une zone aréolaire très appréciable. Quand le vaccin prenait sur les quatre scarifications, on constatait une fièvre modérée.

Avec le vaccin de passage n° 20, j'ai renouvelé les expériences du passage n° 9 ; la peau présenta des pustules avec une dilution au  $500.000^e$  ; au niveau du testicule, réaction légère au  $500.000^e$  et plus intense au  $200.000^e$ . Les deux lapins inoculés par voie cérébrale avec une dilution au  $60.000^e$  succombèrent du neuvième au dixième jour. Les vaccinations humaines furent réalisées avec la même concentration d'émulsion ( $1/5^e$ ). Comme nous étions en pleine saison printanière, j'ai vacciné un plus grand nombre de sujets. Ces sujets, au nombre de trois cent cinquante-quatre, vaccinés pour la première fois, donnèrent trois cent trente-six réactions positives (soit 96 p. 100) et trente, vaccinés pour la deuxième fois, fournirent vingt-cinq résultats positifs (soit 83,33 p. 100).

Le passage n° 34 donna, sur la peau, une pustule à la dilution au  $1/800.000^e$  ; dans le testicule (dilution au  $1/1.000.000^e$ ), l'inoculation provoqua une orchite légère au neuvième jour. Des trois lapins inoculés dans le cerveau avec une dilution au  $1/1.000.000^e$ , l'un succombe le dixième jour, les deux autres survécurent. Les testicules et le cerveau se montrent virulents. Pour les vaccinations humaines, j'ai employé une émulsion au  $1/10^e$ . J'ai vacciné quatre cent quatre-vingt-dix cas pour la pre-

mière fois; dont quatre cent soixante-huit se montrèrent positifs, soit 93,31 p. 100, et cinquante-six revaccinés réagirent dans quarante-sept cas, soit 83,93 p. 100.

La saison des vaccinations étant terminée, je continuai les passages de cerveau à cerveau, en les soumettant tous au contrôle biologique sur le lapin, afin de déterminer si le virus avait acquis son maximum d'exaltation. Le nombre de cerveaux utilisés dans ces expériences fut de trente-six.

RÉSULTATS SUR LA PEAU. — Chez tous les lapins, pustules évidentes à la dilution au 1/800.000<sup>e</sup>, et chez la plupart déjà au 1/100.000<sup>e</sup> (vingt-deux cas). J'ai réalisé les inoculations sur des lapins albinos, étant donné qu'avec de tels animaux j'obtenais de meilleurs résultats (1/1.000.000<sup>e</sup>).

Avec des dilutions au 1/800.000<sup>e</sup>, on obtient des réactions plutôt tardives (du huitième au dixième jour); réaction plus légère, dans le même laps de temps, avec une dilution au 1/100.000<sup>e</sup>.

RÉSULTATS DE L'INOCULATION INTRACÉRÉBRALE. — Tous les lapins inoculés avec des dilutions au 800.000<sup>e</sup> sont morts du septième au quatorzième jour; avec des dilutions au 1/1.000.000<sup>e</sup>, trois des animaux survécurent. Le cerveau du lapin mort au quatorzième jour nous a servi à pratiquer des inoculations sur la peau et dans le testicule, avec un résultat positif marqué.

Auparavant, nous avions déjà établi les concentrations auxquelles les vaccins prennent, d'après des échantillons de *Cow-pox* inoculés dans la peau des lapins. Cependant, avant de commencer la nouvelle saison de vaccination, nous avons voulu compléter notre étude, en comparant les lymphes de veaux n<sup>os</sup> 1770, 1771 et 1772 avec les cerveaux n<sup>os</sup> 66, 67 et 68. Dans ce but, afin que les résultats aient une valeur plus précise, nous fîmes de chaque côté de la ligne médiane du dos du lapin épilé, une série de ponctions intradermiques, chacune avec des dilutions dermovaccinales et neurovaccinales variées.

Les résultats furent les suivants :

*Lapin n<sup>o</sup> 7.* — Côté droit. Cerveau 66; côté gauche: veau n<sup>o</sup> 1770. Pustules des deux côtés, jusqu'à la dilution au 1/800.000<sup>e</sup>.

*Lapins n<sup>os</sup> 2 et 3.* — Inoculation avec des émulsions de cerveaux 67 et 68 et de cow-pox 1771 et 1772; pustules 1/100.000<sup>e</sup>. Chez ces animaux, les pustules dermovaccinales se manifestèrent plus précocement et avec une plus grande intensité qu'avec les échantillons cérébraux.

Pour connaître la valeur pratique du neurovaccin chez



FIG. 1. — *Neurovaccin.*

Type de pustules le plus fréquent à la suite d'une primo-vaccination.

l'homme, il aurait fallu préciser la limite de la concentration utilisable, de manière que les résultats obtenus ne fussent pas inférieurs à ceux des dermovaccins. Au cours du printemps de cette année, nous procédâmes à des vaccinations avec des émulsions au 20<sup>e</sup> (passages cérébraux n<sup>os</sup> 70 et 71).

A cette époque, MM. Levaditi et Nicolau, de l'Institut Pasteur, ont eu l'amabilité, pour laquelle je ne saurais suffi-

samment les remercier, de me remettre par les bons soins de mon ami le D<sup>r</sup> Jimenes, des fragments de cerveau (n° 313), pour en faire une étude comparative avec le virus préparé à l'Institut Alphonse XIII. Cela m'amena à pratiquer les vaccinations avec notre souche sur le bras gauche, réservant le bras



FIG. 2. — *Neurovaccin*.  
Pustules de bonne intensité.

droit pour le virus de Levaditi-Nicolau. Pour l'instant, de l'étude comparée de ces deux souches, je ne puis donner que les tableaux statistiques de la vaccination humaine (voir plus loin).

Avec les souches 70 et 71, préalablement contrôlées sur le lapin, avec des résultats non supérieurs à ceux antérieurement obtenus, nous avons procédé à la vaccination humaine au

moyen d'émulsions glycéринées au 20°. Avec la souche n° 70, on soumet à l'inoculation 447 sujets vaccinés pour la première fois, la plupart âgés de plus de quatre mois; résultats positifs dans 358 cas, soit 80,08 p. 100; ceux âgés de moins de quatre mois (46) fournirent 22 succès, soit 47,87 p. 100.

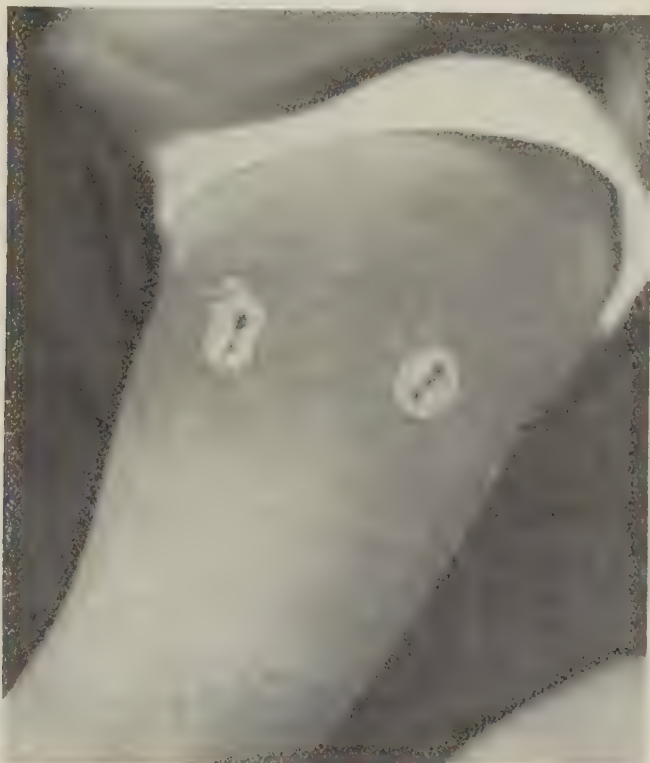


FIG. 3. — *Neurovaccin*.  
Pustules de bonne intensité.

Sur 313 sujets âgés de plus de quatre mois, inoculés avec la souche n° 71, les résultats furent positifs dans 243 cas, soit 77,83 p. 100 et 32 vaccinés âgés de moins de quatre mois fournirent 3 cas positifs, soit 9,66 p. 100.

Ayant terminé l'étude expérimentale sur les lapins et sur l'homme, il restait à déterminer les propriétés du neurovaccin en tant que virus utilisable pour la vaccination des veaux.

Dans ce but, sur un lot de 12 veaux de même race, provenance et âge, nous inoculâmes 6 d'entre eux avec des émulsions cérébrales glycélinées au 1/5<sup>e</sup> (passage n° 70); les 6 autres avec la même émulsion testiculaire, en procédant suivant la



FIG. 4. — *Neurovaccin*.

Réaction intense. Quelques pustules secondaires.

même technique de rasage, de désinfection locale, de scarifications superficielles, etc.

Le résultat fut analogue, aussi bien chez les vaccinés avec les souches cérébrales que chez les inoculés avec les souches testiculaires : la réaction se manifesta par des pustules confluentes à développement normal, sans différence appréciable, au point de vue de leur morphologie et de leur évolution (Voy. tableau II).

\*  
\* \*

Il nous restait à faire des épreuves de résistance du virus cérébral aux diverses *températures*, en nous rapprochant autant

TABLEAU I.

PASSAGE numéros	TITRE d'émulsion	TOTAL des cas	PREMIÈRE VACCINATION				REVACCINÉS			
			Examinés	—	+	p. 100	Examinés	—	+	p. 100
1	1 × 5	6	6	5	4	16,65		0		
9	1 × 5	140	140	56	84	60		0		
20	1 × 5	380	350	14	336	96	30	5	25	83,33
34	1 × 10	546	490	22	468	95,51	56	9	7	83,93

PASSAGE numéros	TITRE d'émulsion	TOTAL des cas	PREMIÈRE VACCINATION sujets âgés de plus de quatre mois				PREMIÈRE VACCINATION sujets âgés de moins de quatre mois			
			Examinés	—	+	p. 100	Examinés	—	+	p. 100
70	1 × 20	493	447	89	358	80,08	46	24	22	47,88
71	1 × 20	345	313	70	243	77,83	32	29	3	9,66

TABLEAU II.

SOUCHE testiculaire	CROUTES obtenues en grammes	MOYENNE par veau en grammes	SOUCHE cérébrale Passage 70	CROUTES obtenues en grammes	MOYENNE par veau en grammes
Veau n° 1 .	100	120	Veau n° 1 .	120	98,33
— n° 2 .	123		— n° 2 .	134	
— n° 3 .	88		— n° 3 .	92	
— n° 4 .	116		— n° 4 .		
— n° 5 .	145		— n° 5 .	102	
— n° 6 .	148		— n° 6 .	142	

que possible des températures que supportent le plus souvent nos lymphes quand elles sont transportées en province, pendant la plus grande partie de l'année.

EXPÉRIENCE N° 1, PASSAGE N° 73. — Quelques centimètres cubes d'émulsion glycinée cérébrale au 1/5<sup>e</sup>, préalablement contrô-

lée et possédant le maximum de virulence ( $1/1.000.000^{\circ}$ ), sont soumis pendant cinq jours à la température de  $23-26^{\circ}$  C. Inoculation :

- a) Dans la peau, qui réagit par de fortes pustules ;
- b) Dans le testicule : réaction légère au  $1/1.000.000^{\circ}$  ;
- c) Dans le cerveau : mort du lapin au douzième jour (dilution au  $1/1.000.000^{\circ}$ ).

EXPÉRIENCE N° 2, PASSAGE N° 75. — Une quantité égale du même type d'émulsion est soumise, pendant onze jours, à une température de  $23-26^{\circ}$ . Elle donne des pustules cutanées au  $1/200.000^{\circ}$  ; au même titre, elle provoque une réaction testiculaire modérément intense et la mort du lapin dans les quinze jours (voie cérébrale).

EXPÉRIENCE N° 3, PASSAGE 75. — Quantité égale de la même émulsion. Après vingt-quatre heures d'étuve à  $37^{\circ}5$ , cette émulsion donne des pustules cutanées au  $1/500.000^{\circ}$ , et, à la même dilution, une orchite nette. Le lapin inoculé par voie intracérébrale meurt le sixième jour.

EXPÉRIENCE N° 4, PASSAGE 75. — On procède de la même manière que précédemment. Après quarante-huit heures d'étuve à  $37^{\circ}5$ , la virulence est en telle décroissance que seules les émulsions au  $1/500^{\circ}$  fournissent des résultats positifs.

\*  
\* \*

Avec les expériences ci-dessus, nous avons terminé nos recherches sur le neurovaccin au point de vue pratique. Avant de rapporter les données recueillies ultérieurement, nous croyons utile de discuter les raisons de nos préférences pour la méthode intradermique de Groth. C'est à cette méthode, en effet, que j'attribue le fait d'avoir obtenu des résultats différents de ceux observés par Levaditi et Nicolau, en ce qui concerne les affinités neurotropes et dermatropes du virus cérébral antivariolique.

D'abord, nous avons essayé la méthode classique de Calmette et Guérin et celle de Kelsch et Camus. Considérant que le par-

lage uniforme des germes est difficile sur la surface irrégulièrement scarifiée, et qu'il fallait plusieurs lapins, dont la réceptivité pouvait être variable, nous abandonnâmes ces méthodes pour employer la suivante :

Nous avons pratiqué des scarifications linéaires des deux côtés



FIG. 5. — *Neurovaccin*.

Pustules normales (revaccination).

du rachis, puis nous avons déposé, à l'aide d'une pipette, une quantité déterminée de diverses dilutions sur chaque scarification. Cette technique nous a permis de contrôler deux souches sur chaque lapin et d'apprécier les résultats suivant que l'éruption était confluyente, discrète ou nulle (schéma de Chauveau). Cependant, il subsistait toujours le fait, pour nous d'une importance capitale, à savoir : l'impossibilité de déter-

miner la quantité de virus retenue par chaque scarification.

Par la méthode de Groth (injections intradermiques), on est toujours sûr que le virus est introduit en un volume déterminé dans le derme. En utilisant des aiguilles fines, on ne perd pas la moindre trace de liquide injecté. Ainsi nous avons la certitude que le virus agit au niveau de chaque piqûre avec une puissance d'action qu'il nous est impossible de déterminer. On en déduit que le procédé de Groth est exactement comparable aux injections intratesticulaires et intracérébrales, et non pas aux scarifications cutanées.

TABLEAU III. — Étude comparative du virus Levaditi et Nicolau à 1 p. 20 et du virus Madrid à 1 p. 20.

ANNÉE	VIRUS	NOMBRE des cas	—	+	P. 100	NOMBRE des cas	—	+	P. 100
1924	Levaditi et Nicolau 1 p. 20 . . . . .	447	210	237	53,02	46	41	5	10,88
	Madrid 1 p. 20 . . .	447	89	358	80,08	46	24	22	47,83

Quelles que soient les souches de vaccins, dermiques ou cérébrales, qui donnent, par scarifications, un titre X, on obtiendra toujours par piqûre intradermique un titre supérieur. En effet, les souches cérébrales, provoquant des orchites vaccinales typiques et tuant le lapin aux dilutions de 1/800.000<sup>e</sup> et de 1/1 000.000<sup>e</sup>, prennent également sur la peau par la méthode intradermique à la même concentration, alors qu'elles ne donnent lieu à aucune pustule par simple scarification.

On peut facilement contrôler deux souches sur un seul lapin, en réalisant sept injections de dilutions diverses : six avec la souche à étudier, et une septième avec une lymphé de titre déjà connu. La régularité des résultats a été vérifiée pour de nombreux échantillons de dermovaccin. C'est là un procédé qui permet une comparaison exacte avec les résultats des injections testiculaires et intracérébrales. C'est ce qui nous a décidé à l'utiliser dans nos recherches sur le neurovaccin.

Ces recherches nous ont montré que les propriétés d'un virus fixe ne s'acquièrent qu'après un grand nombre de passages de cerveau à cerveau. Les qualités du *virus fixe* ne sauraient être

appréciées, comme certains auteurs le prétendent, par la mort du lapin à une date déterminée, toujours la même; à notre avis, il faut, en outre, que le germe arrive à une limite d'exaltation, qui n'augmente plus par des passages ultérieurs. *Nous pouvons affirmer que le maximum de virulence n'est acquis qu'après trente-quatre passages cérébraux.*

Les résultats statistiques de la vaccination humaine avec les passages nos 20, au  $1/5^{\circ}$ , et 34, au  $1/10^{\circ}$ , confirment cette progression de la virulence initiale. Avec le passage n° 20, dilution au  $1/5^{\circ}$ , nous sommes arrivé à 96 p. 100 de résultats positifs chez les sujets vaccinés pour la première fois, et avec le passage n° 24, dilution au  $1/10^{\circ}$ , nous avons eu 95,51 p. 100 de vaccinations positives. Ces résultats sont supérieurs à ceux enregistrés avec les passages nos 70 et 71 (dilution au  $1/20^{\circ}$ ) [80,08 p. 100 et 77,83 p. 100, résultats positifs].

En outre, nous avons observé, dans nos expériences, l'égalité des affinités pour la peau, le testicule et le cerveau, avant et après que le virus avait acquis le maximum d'exaltation.

\*  
\* \*

Voici, d'autre part, les caractères macroscopiques des pustules, leur évolution et les complications auxquelles elles donnent lieu :

Sur la peau du lapin, les manifestations apparaissent du deuxième au troisième jour avec des émulsions concentrées; du quatrième au cinquième jour, avec des dilutions plus étendues. Au début, on constate une légère inflammation au point d'injection, qui augmente progressivement les jours suivants et devient surélevée. Il se forme une petite vésicule purulente qui, en peu de temps, noircit et s'étend, formant une escarre sèche, plus ou moins étendue, suivant le titre de l'émulsion. L'escarre finit par se détacher. Certains animaux perdent l'appétit, maigrissent, mais ils ne succombent que rarement. A ce point de vue, on ne constate nulle différence avec les souches Cow-pox, étudiées par nous.

Chez l'homme, la période d'incubation des pustules neurovaccinales est, dans certains cas, de huit, neuf et dix jours. Assez fréquemment, ces pustules n'occupent pas toute l'étendue

de la scarification linéaire. Elles présentent la même forme et les mêmes caractères qu'avec les souches dermiques.

Nous eûmes l'occasion d'observer parfois des réactions plus violentes et une zone inflammatoire intense avec des petites pustules-filles. Dans d'autres cas, il fut constaté des escarres précoces, çà et là des réactions plus ou moins étendues et des pustules secondaires par auto-inoculation et grattage. Les cas d'infection secondaire par rupture de pustule furent extrêmement rares, et nous n'avons jamais observé de généralisation. Chez les veaux, le développement et l'évolution des pustules furent toujours plus ou moins semblables à celles produites par des vaccins d'autre provenance.

\*  
\* \*

Nos *conclusions* sont les suivantes :

1° L'adaptation du vaccin jennérien au cerveau du lapin s'obtient dès le premier passage, si l'on part d'un virus cultivé au préalable dans le testicule du lapin ;

2° Le maximum de virulence du neurovaccin n'est atteint qu'après trente passages cérébraux au moins ;

3° Nous avons enregistré des résultats positifs chez l'homme dès le premier passage cérébral ;

4° Les qualités vaccinales sont peut-être un peu inférieures à la plupart des dermovaccins, avec le passage n° 20 ; mais elles sont entièrement semblables avec le passage n° 34 ;

5° Les résultats chez le lapin et chez l'homme sont identiques, tout en tenant compte de la réceptivité et des méthodes d'inoculation utilisées ;

6° Le virus neurovaccinal offre les mêmes affinités pour la peau, le testicule et le cerveau ;

7° Les caractères et l'évolution des pustules neurovaccinales, aussi bien chez l'homme que chez le veau, ou le lapin, sont les mêmes que celles observées avec un vaccin de grande virulence ;

8° A concentration égale, le neurovaccin n'est pas inférieur à la plupart des lymphes utilisées ;

9° Il a, sur le dermovaccin, l'avantage d'être pur. A cela

s'ajoutent la rapidité et la facilité de sa préparation et de son utilisation immédiate;

10° Dans notre pays, son emploi réaliserait une économie appréciable.

\*  
\* \*

Je désire insister sur quelques-unes de mes conclusions que je n'ai pas discutées au cours de ce travail.

Les conditions de pureté du neurovaccin lui confèrent une valeur indiscutable. Nous savons que les vaccins antivarioliques contiennent une grande quantité de germes étrangers au virus. Ceci oblige à soumettre les pulpes à une épuration pendant trois ou quatre semaines. Les germes habituels se trouvant sur la peau des veaux ne sont pas pathogènes pour l'homme, mais on ne peut nier la possibilité d'une contamination des animaux dans les étables par certains microbes pathogènes, lesquels peuvent résister à l'épuration la plus rigoureuse et passer inaperçus. Ceci se produit dans la majorité des cas, si on ne réalise pas un contrôle bactériologique des plus sévères. Dans notre pays, il n'est pas rare de voir des phlegmons apparaître, même après vaccination directe en partant du veau.

La préparation facile et rapide du neurovaccin rendra certainement de grands services. Les centres où l'on peut fabriquer des pulpes de veaux sont nécessairement rares; l'installation des étables et de leurs dépendances est coûteuse et, d'autre part, la préparation du vaccin nécessite un personnel spécialisé. Par contre, pour obtenir de bonnes lymphes cérébrales, il ne faut que des cages susceptibles d'une bonne désinfection et un spécialiste possédant quelques connaissances bactériologiques.

En Espagne, où, dans la majorité de ses provinces, il existe des laboratoires avec des bactériologistes compétents, il serait très facile que ces bactériologistes se mettent au courant de la technique et que, pendant les époques de chaleur intense, ils assurent la vaccination antivariolique à l'aide de petites quantités de neurovaccin fraîchement préparées, garantissant le résultat. Les lots de Cow-pox que nous envoyons dans nos îles Canaries arrivent, dans la majorité des cas, complètement sté-

riles, et ceux qui sont envoyés à Fernando Pô ne sont utilisables que transportés dans une glacière et utilisés dès leur réception.

Dans notre Institut, la moyenne des croûtes obtenues sur les veaux vaccinés avec des cultures testiculaires est de 140 grammes, lesquelles, multipliées par cinq volumes de glycérine, donnent 700 grammes de lymphe. Les dépenses sont les suivantes : acquisition du veau : 60 pesetas ; son alimentation pendant deux mois, 60 pesetas ; antiseptiques et pansages, 2 pesetas ; total : 122 pesetas.

Voyons les frais du vaccin cérébral (même type d'émulsion) : avec le lapin, on obtient une moyenne de 144 grammes de masse cérébrale (8 grammes par lapin), ce qui, multiplié par cinq volumes de glycérine, donne 720 grammes de lymphe. Coût : 18 lapins à 5 pesetas = 90 pesetas. La différence en faveur du neurovaccin est de 32 pesetas, malgré que nous ayions attribué un prix inférieur à la dépense réelle du fourrage des veaux et que, d'autre part, nous ayions calculé d'après une émulsion de neurovaccin à  $1/5^{\circ}$ , alors qu'en réalité, nous utilisons toujours nos émulsions cérébrales à  $1/10^{\circ}$ .

A l'heure qu'il est, il a été envoyé dans les diverses provinces plus de un million de doses de neurovaccin, sans qu'une seule plainte ait été formulée (1).

(1) Le neurovaccin est également préparé et utilisé par le Laboratoire municipal de Barcelone (Levaditi).

## LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1924

par JULES VIALA, Préparateur au Service antirabique.

Pendant l'année 1924, 764 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur de Paris : 2 sont mortes de la rage. Mais chez l'une d'entre elles, la rage s'est déclarée moins de quinze jours après la fin du traitement; elle doit être défalquée pour le calcul de la mortalité.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées . . . . .	764
Mort . . . . .	1
Mortalité p. 100. . . . .	0,14

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine :

ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100	ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100
1886	2.671	25	0,94	1906	772	1	0,13
1887	2.770	14	0,79	1907	786	3	0,38
1888	1.622	9	0,55	1908	524	1	0,19
1889	1.830	7	0,38	1909	467	1	0,21
1890	1.540	5	0,32	1910	401	0	0,00
1891	1.559	4	0,25	1911	341	1	0,29
1892	1.790	4	0,22	1912	395	0	0,00
1893	1.648	6	0,36	1913	330	0	0,00
1894	1.387	7	0,50	1914	373	0	0,00
1895	1.520	5	0,38	1915	654	1	0,15
1896	1.308	4	0,30	1916	1.388	3	0,21
1897	1.529	6	0,39	1917	1.543	4	0,26
1898	1.465	3	0,20	1918	1.803	3	0,16
1899	1.614	4	0,25	1919	1.813	3	0,16
1900	1.420	4	0,28	1920	1.126	6	0,53
1901	1.321	5	0,38	1921	998	1	0,10
1902	1.005	2	0,18	1922	754	0	0,00
1903	628	2	0,32	1923	727	0	0,00
1904	755	3	0,39	1924	764	1	0,14
1905	721	3	0,41				

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

*Tableau A.* — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

*Tableau B.* — Personnes pour lesquelles la rage de l'animal mordeur est constatée par examen vétérinaire.

*Tableau C.* — Personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Nous donnons ci-après la répartition entre ces catégories des personnes traitées en 1924 :

ANNÉE 1924	MORSURES à la tête			MORSURES aux mains			MORSURES aux membres			TOTAUX		
	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100
Catégorie A. .	10	0	0	94	0	0	31	0	0	135	0	0
Catégorie B. .	45	0	0	118	0	0	75	0	0	208	0	0
Catégorie C. .	23	0	0	206	1	1,20	192	0	0	421	1	0,23
	48	0	0	418	1		298	0		764	1	0,14

Au point de vue de leur nationalité, les personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

Egypte. . . . .	1
Hollande . . . . .	1
Iles Canaries. . . . .	1
Portugal. . . . .	1
Principauté de Monaco . . . . .	1

**Répartition par départements des 759 personnes traitées mordues en France.**

Ain. . . . .	2	Ariège . . . . .	1
Aisne. . . . .	5	Aube. . . . .	1
Algérie. . . . .	3	Aveyron . . . . .	2
Ardenes . . . . .	3	Calvados . . . . .	4

Cantal . . . . .	30	Meurthe-et-Moselle . . . . .	1
Charente-Inférieure. . . . .	1	Meuse . . . . .	3
Cher . . . . .	5	Morbihan . . . . .	12
Corrèze. . . . .	27	Moselle. . . . .	1
Côte-d'Or. . . . .	2	Nièvre . . . . .	5
Côtes-du-Nord. . . . .	15	Nord . . . . .	1
Creuse . . . . .	2	Oise . . . . .	10
Eure . . . . .	6	Orne . . . . .	5
Eure-et-Loir . . . . .	2	Pas-de-Calais . . . . .	4
Finistère . . . . .	27	Puy-de-Dôme. . . . .	8
Gard . . . . .	2	Rhin (Bas-) . . . . .	11
Ille-et-Vilaine. . . . .	23	Rhin (Haut-) . . . . .	9
Indre. . . . .	3	Rhône . . . . .	1
Indre-et-Loire. . . . .	5	Rhône (Bouches-du-) . . . . .	4
Isère . . . . .	2	Saône-et-Loire . . . . .	4
Jura . . . . .	2	Saône (Haute-) . . . . .	1
Loire. . . . .	1	Sarthe . . . . .	3
Loire-Inférieure. . . . .	9	Seine. . . . .	245
Loiret . . . . .	5	Seine-et-Marne . . . . .	22
Loir-et-Cher . . . . .	5	Seine-et-Oise. . . . .	75
Lot. . . . .	22	Seine-Inférieure . . . . .	42
Lot-et-Garonne. . . . .	1	Sèvres (Deux-) . . . . .	3
Lozère . . . . .	2	Somme . . . . .	6
Maine-et-Loire . . . . .	5	Tunisie. . . . .	2
Manche. . . . .	15	Vendée. . . . .	3
Marne . . . . .	7	Vienne . . . . .	11
Marne (Haute-) . . . . .	3	Vienne (Haute-) . . . . .	8
Maroc . . . . .	1	Vosges. . . . .	1
Mayenne . . . . .	4	Yonne . . . . .	6

**Personne traitée morte de la rage après le traitement.**

Vincent (Armand), soixante-six ans, demeurant à Savoisy (Côte-d'Or). Mordu le 28 juillet : trois morsures pénétrantes, face dorsale main droite, qui ont saigné.

Traité du 29 juillet au 12 août.

Pris de rage le 8 octobre, mort le 12 octobre.

Vincent avait été mordu par un chien reconnu comme suspect de rage à l'autopsie par M. Naudot, médecin-vétérinaire à Montbard (Côte-d'Or).

**Personne morte de la rage  
moins de quinze jours après la fin du traitement.**

Brouwer (Philippe), quarante-cinq ans, demeurant au Havre (Seine-Inférieure). Mordu le 21 mars, à la paume de la main droite; deux morsures pénétrantes.

Traité du 25 mars au 11 avril.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui, le 18 avril, il meurt le 21 avril.

Brouwer avait été mordu par un chien reconnu enragé, après autopsie, par M. Lesueur, médecin-vétérinaire au Havre.

Le bulbe de l'animal mordeur, inoculé dans l'œil à des cobayes, a donné la rage le vingtième jour.

L'examen histologique des centres nerveux du chien, fait par M. Manouëlian, a montré que l'animal est mort de la rage.

Ce chien avait mordu treize personnes qui ont subi le traitement à l'Institut Pasteur et qui se portent bien.

\*  
\* \*

Depuis 1912, l'Institut Pasteur a adopté la méthode de conservation en glycérine des moelles atténuées, introduite dans la pratique par A. Calmette.

On se sert de pots-bans d'une contenance de 50 cent. cubes.

Dans chacun, on verse 25 cent. cubes de glycérine à 30° B°, neutre.

On stérilise à 120°, pendant vingt minutes.

On laisse refroidir et on introduit dans chaque pot-ban quelques fragments de moelles préalablement desséchées dans un flacon de potasse, d'après la méthode initiale de Pasteur.

Dans chaque flacon contenant la glycérine on peut mettre plusieurs fragments de moelle dont la longueur totale peut atteindre 5 centimètres.

On conserve ces flacons à la glacière aux environs de  $+4^{\circ}$ .

Pour éviter l'infection de la moelle chez les lapins paralysés et agonisants, on place ces derniers à même dans la glace.

Sitôt qu'ils sont morts, on extrait la moelle par la méthode d'Oshida, au moyen d'un mandrin métallique nickelé stérile (1).

On n'utilise, pour la vaccination des personnes mordues, que des moelles ayant séjourné *moins de vingt jours* en glycérine, l'expérience ayant montré que le degré d'atténuation de chaque moelle n'est pas sensiblement modifié pendant les vingt premiers jours.

(1) Ces mandrins (modèle de Jules Viala) sont construits par la fabrique d'instruments de chirurgie Collin, rue de l'École-de-Médecine, à Paris.

Nous reproduisons ci-après, parce qu'il nous a été demandé de divers côtés, le schéma des traitements suivis par les mordus, suivant la gravité de leurs morsures.

### Injectons antirabiques.

1 <sup>er</sup> jour . . . . .	Moelle de 5 jours	} 3 cent. cubes
2 <sup>e</sup> — . . . . .	— 5 —	
3 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 —	
4 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 —	
5 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 —	
6 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 —	
7 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 —	
8 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 —	
9 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 —	
10 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 —	
11 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 —	} <i>Morsures</i>
12 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 —	
13 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 —	
14 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 —	
15 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 —	
16 <sup>e</sup> jour . . . . .	Moelle de 4 jours	} 3 cent. cubes
17 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 —	
18 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 —	
19 <sup>e</sup> jour . . . . .	Moelle de 3 jours	} 3 cent. cubes
20 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 —	
21 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 —	
22 <sup>e</sup> jour . . . . .	Moelle de 3 jours	} 3 cent. cubes
23 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 —	
24 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 —	
25 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 —	

*légères.*

*Morsures multiples.*

*Morsures graves.*

*Morsures à la tête.*

Le Gérant : G. MASSON.

